



**UFAM**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA  
DA AMAZÔNIA LEGAL – REDE BIONORTE

ISRAEL PAES ROMANO

**SELEÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS AMAZÔNICOS PRODUTORES DE  
LIPASES PARA BIOCATÁLISE ENANTIOSSELETIVA EM MEIO ORGÂNICO**

MANAUS - 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E  
BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL – REDE BIONORTE

ISRAEL PAES ROMANO

**SELEÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS AMAZÔNICOS PRODUTORES DE  
LIPASES PARA BIOCATÁLISE ENANTIOSSELETIVA EM MEIO ORGÂNICO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE pela Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração em Bioprospecção, bioprocessos e bioprodutos.

**Orientadora:** Dra. Sandra Zanotto

**Co-orientador:** Dr. Spartaco Astolfi Filho

MANAUS  
2020

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R759l Romano, Israel Paes  
Seleção de isolados fúngicos amazônicos produtores de lipases para biocatálise enantiosseletiva em meio orgânico / Israel Paes Romano . 2020  
87 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Sandra Patricia Zanotto  
Coorientador: Spartaco Astolfi Filho  
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. lipase. 2. biocatálise. 3. biomassa. 4. enantiosseletividade. 5. fungos amazonicos. I. Zanotto, Sandra Patricia. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ISRAEL PAES ROMANO

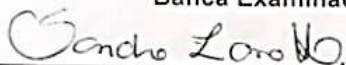
"SELEÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS AMAZÔNICOS PRODUTORES DE LIPASES PARA BIOCATALISE ENANTIOSELETIVA EM MEIO ORGÂNICO".

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador (a): **Profa. Dra. Sandra Patricia Zanotto**

Coorientador (a): **Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho**


Banca Examinadora:



Profa. Dra. Sandra Patricia Zanotto (UFAM)  
Presidente da banca



Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez (INPA)  
Membro



Prof. Dr. José Odair Pereira (UFAM)  
Membro



Prof. Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio (UEA)  
Membro



Profa. Dra. Hileia dos Santos Barroso (UEA)  
Membro

MANAUS-AMAZONAS  
Fevereiro/2020

## RESUMO

Lipases (3.1.1.3) são enzimas altamente versáteis para biocatálise. A atividade sintética e enantiosseletiva destas enzimas em meio orgânico tem aplicação na obtenção de substâncias químicas de alto valor agregado, como blocos quirais para síntese e fármacos enantiopuros. A procura por microrganismos fornecedores de novas lipases úteis para a biotecnologia continua sendo um tópico de grande relevância. Neste estudo, foi investigado o potencial da biomassa de seis linhagens de *Aspergillus* e de quatorze linhagens fúngicas não-identificadas, todas coletadas na região amazônica, como fonte de lipases ligada ao micélio para aplicações em biocatálise, tanto em meio aquoso (atividade hidrolítica) como em meio orgânico (atividade sintética e enantiosseletiva). Compararam-se os efeitos de três tratamentos da biomassa sobre a atividade hidrolítica. A atividade sintética foi avaliada por um ensaio de transesterificação e quantificada por duas metodologias diferentes. A capacidade enantiosseletiva das lipases foi avaliada por meio da resolução do fármaco (*R,S*)- ibuprofeno. Verificou-se que, para quinze isolados, a biomassa submetida ao tratamento de remoção de lipídios superficiais (delipidação) apresentou melhores resultados na hidrólise do palmitato de *p-nitrofenila*, em comparação com os outros dois tratamentos. A biomassa delipidada de seis linhagens de *Aspergillus* e da linhagem UEA\_115 apresentou elevada atividade de síntese de palmitato de etila por transesterificação em meio orgânico. Os resultados foram confirmados por espectrofotometria (410 nm) e cromatografia gasosa. Nesta reação, o isolado DPUA\_1539 *A. flavo-furcatis* alcançou o valor máximo de  $668,5 \pm 23,5$  mU.g<sup>-1</sup>. Os ensaios de atividade enantiosseletiva indicaram que lipases ligadas a biomassa dos isolados UEA\_115 ( $E = 3,58$ ;  $ees = 7 \pm 0$ ) e, em especial, do isolado DPUA\_1539 *A. flavo-furcatis* ( $E = 24,15$ ;  $ees = 91 \pm 1$ ), possuem a capacidade de discriminar os enantiômeros do fármaco ibuprofeno pela síntese de éster, preferencialmente com o (*R*)-enantiômero. Estes resultados encorajam investigações adicionais destes fungos como potenciais fornecedores de lipase para processos biocatalíticos, como a produção de biodiesel e a obtenção de fármacos enantiopuros.

## ABSTRACT

Lipases (3.1.1.3) are highly versatile enzymes for biocatalysis. The synthetic and enantioselective activity of these enzymes in organic medium has application in the production of high value-added chemicals, such as chiral blocks for synthesis and enantiopure drugs. The search for microorganisms that supply new lipases useful for biotechnology remains a topic of great relevance. We investigated in this study the biomass potential of six *Aspergillus* strains and fourteen unidentified fungal strains, all collected in the Amazon region, as a source of mycelial-bound lipases for biocatalysis applications, both in aqueous medium (hydrolytic activity) and in organic medium (synthetic and enantioselective activity). The effect of three biomass treatments on hydrolytic activity was compared. The synthetic activity was evaluated by a transesterification assay and quantified by two different methodologies. The enantioselective capacity of lipases was evaluated by resolution of the drug (R, S) - ibuprofen. We verify that, for fifteen isolates, the delipidated biomass presented better results in the hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate compared to the other two treatments. The delipidated biomass of six strains of *Aspergillus* and UEA\_115 strain presented high ethyl palmitate synthesis activity by transesterification in organic medium. The results were confirmed by spectrophotometry (410 nm) and gas chromatography. In this reaction, the isolate DPUA\_1539 *A. flavo-furcatis* achieved the maximum value of  $668.5 \pm 23.5$  mU.g<sup>-1</sup>. Enantioselective activity assays indicated that biomass-bound lipases of the isolates UEA\_115 ( $E = 3.58$ ;  $ees = 7 \pm 0$ ) and, in particular, of the isolate DPUA\_1539 *A. flavo-furcatis* ( $E = 24.15$ ;  $ees = 91 \pm 1$ ), have the ability to discriminate the enantiomers of the drug ibuprofen by the synthesis of ester, preferably with the (*R*)-enantiomer. These results encourage further investigations of these fungi as potential suppliers of lipase for biocatalytic processes, such as the production of biodiesel and the production of enantiopure drugs.

## DEDICATÓRIA

A Flávio J. Luizão (1950-2019), notável cientista e meu irmão de fé em Cristo; e a Cleonir Paes Monteiro (1945-2020) um dos meus mais importantes mentores na fé.

Dedico *in memoriam*

*“Grandes são as obras de Jeová;  
Todos os que tem prazer nelas as estudam.”*

**Salmo 111: 2**



## AGRADECIMENTOS

A Jeová Deus, o Criador do Universo, que “ dá a todos vida, fôlego e todas as coisas” (Atos 17:25).

À minha querida esposa Marilena, uma dádiva de Deus em minha vida, que valorizo mais e mais com o passar dos anos.

Aos meus queridos pais Carlos e Socorro, que me ensinaram com amor as lições mais importantes da vida.

Aos meus irmãos e irmãs, madrasta, tios, primos, cunhados e sobrinhos: esta realização é de todos nós.

Minha profunda gratidão à minha orientadora, Dra. Sandra Patricia Zanotto, por ter acreditado em mim desde o mestrado e por ter me ensinado com carinho a ‘voar com minhas próprias asas.’

Minha profunda gratidão também ao meu co-orientador , Dr. Spartaco Astolfi Filho, pelo apoio com recursos, pelas sugestões valiosas e por ser um exemplo de cientista e de professor.

À Dra. Hileia Barroso e ao Dr. Raimundo Pereira Junior, por todas as dicas e ensinamentos. A colaboração de vocês foi fundamental para a realização desta tese.

Ao Dr Ivaldo Itabaiana Junior, pelos ensinamentos e recursos disponibilizados, sinceramente grato pela valiosa colaboração.

Ao estimado Vanderlei Saboia, irmão de bancada, companheiro solidário em várias situações. À Ana Carolina Louzada e Celina Silva, pelo apoio na execução dos experimentos e ajuda nos momentos difíceis, com muita gratidão; a Emerson Bacelar, pelo suporte no laboratório e pelas “discussões filosóficas”.

Aos colegas de laboratório e alunos do doutorado de Biotecnologia, em especial: Hilton Marcelo e Rodrigo Cunha (meus irmãos de bancada também, com muito carinho), Rogério Neves, Andrey Damasceno, Dolores Fonseca, e André Higa, grato pela troca de experiências.

Aos professores do PPG Rede Bionorte, em especial os Drs. Edson Junior Carmo, Adolfo Mota, Ceci Sales-Campos, Antonia de Souza Queiroz e Edmar Vaz de Andrade, pela competência profissional, apoio e incentivo.

Àos Drs. José Odair e Cecilia Nunez, membros da banca da defesa, pelas sugestões e questionamentos que enriqueceram este trabalho. Grato também ao Dr. André Willerdig, por suas valiosas contribuições dadas durante o meu exame de qualificação.

Ao Dr. Rudi Procópio, membro tanto de minha banca de qualificação quanto da de defesa, um agradecimento especial pelas linhagens que me forneceu e pela cordialidade com que sempre me recebeu em seu laboratório.

Ao Dr. Felipe Mesquita da Central Analítica da UFAM e ao doutorando Júlio Nino (obrigado pelo companheirismo e paciência, Júlio!) da Central de Apoio Multidisciplinar, pelo apoio nas análises cromatográficas e ensinamentos.

A Dra. Maria Francisca Teixeira Simas e à sua equipe da Coleção de Microrganismos da DPUA- UFAM, pela gentil concessão de linhagens fúngicas, orientações sobre como armazená-las e outras lições importantes para a realização deste trabalho.

A Dra. Marli Camassola e sua equipe da Universidade de Caxias do Sul (UCS), pelos ensinamentos e experiências compartilhados comigo durante o curso que participei na UCS em setembro de 2016.

Aos Drs. Hector Koolen, Larissa Kirsch e Cleiton Fantin, do MBT-UEA, pela colaboração em diversos momentos no decurso deste trabalho.

Aos meus colegas professores do IFAM Campus Parintins, em especial ao diretor Kleber de Britto Souza e ao professor Romison Teixeira, pela compreensão e apoio.

À FAPEAM pela concessão a bolsa de doutorado, e à UEA e à UFAM pela infraestrutura.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Enantiosseletividade na esterificação do ( <i>R,S</i> )-ibuprofeno.....	61
Tabela 2 - Espécies/grupos taxonômicos dos fungos testados. Dados fornecidos pelos pesquisadores que cederam as linhagens (exceto para UEA_115).....	78

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Testes ANOVA de igualdade entre as médias e pós-teste de Tukey da atividade hidrolítica das biomassas delipidada, não-delipidada e crescida em meio sem indutor, de vinte isolados fúngicos.....	55
Figura 2 - Testes de igualdade entre as médias da atividade hidrolítica da biomassas delipidada de vinte isolado fúngicos.....	56
Figura 3 - Cromatograma da transesterificação biocatalisada pelo isolado DPUA_1539, indicando os picos correspondentes ao padrão interno palmitato de metila (PI), ao produto (PEt) e ao reagente limitante (pNPP).....	58
Figura 4 - Atividade sintética relativa do isolados fúngicos, calculada a partir da atividade específica determinada por CG-DIC e por espectrofotometria .....	59
Figura 5 - Enantiopreferência pelo (R)-enantiômero na reação de esterificação do ibuprofeno racêmico biocatalisada pelo isolado DPUA_1539 <i>A. flavo-furcatis</i> , após 96h de reação .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

A.P.A.	área do pico do padrão analítico
A.P.I.	área do pico do padrão interno
ASP	aspartato (ácido aspártico)
c	conversão percentual
CG	cromatografia gasosa
CG-DIC	cromatografia gasosa com detector de ionização em chama.
E	razão enantiomérica
EC	Comissão de Enzimas (inglês)
ee <sub>s</sub>	excesso enantiomérico do substrato
FR	fator de resposta
GLU	glutamato (ácido glutâmico)
HIS	histidina
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência (inglês), ou CLAE
IUBMB	União Internacional para Bioquímica e Biologia Molecular (inglês)
ln	logaritmo neperiano
MSTFA	N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida
mU.g	miliunidades enzimáticas por grama
PEt	palmitato de etila
PMEt	palmitato de metila
pNP	p-nitrofenol (inglês)
pNPP	palmitato de p-nitrofenila (inglês)
PTFE	politetrafluoretileno
SER	serina
U.g	unidades enzimáticas por grama
UFLC	cromatografia líquida ultra-rápida (inglês)
WAE	proteínas associadas à parede [celular] (inglês)

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Abordagens da engenharia de proteínas para desenvolver biocatalisadores .....	23
Esquema 2 - - Capacidade enzimática de discriminar entre enantiômeros, de acordo com a teoria dos 3 pontos de Ogstron .....	27
Esquema 3 - Etapas do mecanismo catalítico da lipase .....	32

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
2.1	BIOCATÁLISE: CONCEITO, HISTÓRICO E DESENVOLVIMENTOS RECENTES .....	21
2.1.1	Enzimas – aspectos gerais .....	25
2.1.2	Enzimas em meio orgânico .....	27
2.1.3	Vantagens e limitações.....	29
2.2	LIPASES .....	31
2.2.1	Classificação e estrutura .....	31
2.2.2	Aplicações biotecnológicas e métodos de triagem da atividade hidrolítica de lipases .....	32
2.2.3	Aplicações biotecnológicas e métodos de triagem da atividade sintética de lipases .....	33
2.2.4	Aplicações biotecnológicas da atividade sintética enantiosseletiva.....	36
2.3	FUNGOS.....	37
2.3.1	Fungos endofíticos .....	39
2.3.2	Fungos fitopatogênicos.....	40
2.3.3	Macrofungos degradadores de madeira .....	40
2.4	COLEÇÕES BIOLÓGICAS COMO FONTE POTENCIAL DE NOVOS BIOCATALISADORES.....	41
<b>3</b>	<b>ARTIGO - AVALIAÇÃO DA BIOMASSA DE FUNGOS AMAZÔNICOS COMO FONTE DE LIPASES PARA BIOCATÁLISE</b> .....	<b>42</b>
3.1	ABSTRACT : EVALUATION OF AMAZONIAN FUNGI BIOMASS AS A SOURCE OF LIPASES FOR BIOCATALYSIS .....	43
3.2	INTRODUÇÃO .....	44
3.3	PARTE EXPERIMENTAL.....	46
3.3.1	Reagentes .....	46
3.3.2	Microrganismos e condições de cultivo .....	46
3.3.2.1	Procedência dos isolados .....	46
3.3.2.2	Fermentação submersa .....	47

3.3.2.3	Fermentação em meio sem indutor.....	48
3.3.3	Preparação do micélio para uso como biocatalisador .....	48
3.3.3.1	Coleta e dessecação .....	48
3.3.3.2	Delipidação, trituração e peneiramento.....	48
3.3.3.3	Biomassa não-delipidada e biomassa cultivada sem indutor .....	49
3.3.4	Avaliação da atividade hidrolítica.....	49
3.3.4.1	Ensaio enzimático .....	49
3.3.4.2	Testes estatísticos .....	50
3.3.5	Avaliação da atividade sintética.....	50
3.3.5.1	Ensaio enzimático de transesterificação em meio orgânico.....	50
3.3.5.2	Determinação por espectrofotometria da atividade sintética pela detecção do pNP liberado .....	51
3.3.5.3	Determinação da atividade sintética pela detecção da formação de PEt por CG-DIC.....	51
3.3.6	Avaliação da atividade enantiosseletiva .....	52
3.3.7	Identificação molecular .....	54
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
3.4.1	Avaliação da atividade hidrolítica.....	54
3.4.1.1	Comparação dos tratamentos .....	54
3.4.1.2	Comparação dos resultados obtidos com a biomassa delipidada...	56
3.4.2	Avaliação da atividade sintética.....	58
3.4.3	Avaliação da enantiosseletividade.....	61
3.4.4	Identificação molecular .....	63
3.5	CONCLUSÃO .....	64
3.6	AGRADECIMENTOS .....	64
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>78</b>
6.1	Espécies/grupos taxonômicos dos fungos testados.....	78
6.2	Galeria de imagens .....	79



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A biocatálise – também chamada de biotransformação por alguns autores - tem se tornado uma ferramenta cada vez mais importante da biotecnologia. Este campo de pesquisa em alguns casos possibilitou reações que não são facilmente conduzidas pela química orgânica clássica; em outros casos, promoveu reações que podem substituir etapas químicas de alto custo energético e/ou ambiental. Cerca de dois terços da pesquisa em biotransformação envolvem hidrolases, com especial destaque para as lipases (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017; GUERRAND, 2017).

Lipases são triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3) cuja capacidade de realizar tanto reações hidrolíticas como de síntese - conforme o meio reacional seja aquoso ou não-aquoso - tem sido extensivamente estudadas e empregadas na indústria já por várias décadas (DAIHA et al., 2015; KOURIST; HOLLMANN; NGUYEN, 2014; SALIHU; ALAM, 2015). Detergentes, desengordurantes e outros agentes de limpeza são algumas das aplicações consolidadas da atividade hidrolítica destas enzimas. A atividade sintética de lipase, por sua vez, tem aplicações de grande interesse econômico e alto impacto na qualidade de vida, como a produção de cosméticos, de alimentos funcionais enriquecidos com ácidos graxos poli-insaturados e de biodiesel a partir de resíduos oleaginosos (HAMA; NODA; KONDO, 2018; IMANPARAST; HAMEDI; FARAMARZI, 2018; KOURIST; HOLLMANN; NGUYEN, 2014). O biodiesel é um combustível líquido composto por monoalquil ésteres e pode ser obtido por transesterificação biocatalisada. Em ambientes aquorrestritos, lipases podem sintetizar monoalquil ésteres a partir da transesterificação de triacilgliceróis, tornando o processo mais atrativo para o uso com matérias-primas de baixo valor agregado (CIUDAD et al., 2011; HAMA; NODA; KONDO, 2018).

Lipases com atividade sintética enantiosseletiva são muito úteis para a resolução de racematos e obtenção de blocos quirais para síntese química. O mercado para compostos enantiopuros está em crescimento, tornando a obtenção destas moléculas um atrativo de campo de pesquisa (HUDLICKY; REED, 2009; YUAN et al., 2019). Por exemplo, o ibuprofeno – um dos medicamentos mais consumidos no mundo – é uma molécula quiral cuja atividade farmacológica reside majoritariamente no (S)-enantiômero, o qual é 160 vezes mais ativo que o correspondente (R)-

enantiômero. Assim, a obtenção economicamente viável do (S)-enantiômero opticamente puro é de grande interesse.(GHANEM et al., 2010; JOSÉ; TOLEDO; BRIAND, 2015; YUAN et al., 2019) .

As numerosas aplicações industriais das lipases têm estimulado a procura de novas enzimas desta subclasse, a partir de novas fontes. As lipases microbianas têm sido mais amplamente empregadas em processos industriais do que as derivadas de plantas e animais devido à sua maior termoestabilidade, tolerância a variações de pH e estabilidade em solventes orgânicos. Além disso, elas têm maiores rendimentos de produção, facilidade de manipulação genética e crescimento rápido em meios de baixo custo. Entre as fontes microbianas, os fungos filamentosos se destacam como fornecedores de lipases para uma ampla - e sempre crescente - gama de aplicações (GEOFFRY; ACHUR, 2018; MEHTA; GROVER; GUPTA, 2018).

Espécies da biodiversidade de fungos da Amazônia, potencial fonte de enzimas para diversos campos da biotecnologia, ainda estão pouco conhecidas, embora os estudos acerca da biocatálise tenham avançado mundialmente. Trabalhos de screening da biodiversidade em busca de novos biocatalisadores contribuem para o conhecimento e valorização dos recursos naturais amazônicos, fortalecendo as iniciativas para a conservação destes recursos (ZANOTTO et al., 2009). Por outro lado, além de promover pesquisas que realizem novas coletas de material biológico e que promovam o isolamento de novos microrganismos, é necessário também conhecer e disseminar a informação sobre o que já foi coletado ao longo de muitos anos e encontra-se depositado nas coleções biológicas.

O aprimoramento de ensaios e de métodos de quantificação da atividade enzimática para triagem de lipases também é um tópico de grande relevância (PÖHNLEIN et al., 2015; ZHANG et al., 2012; ZHENG et al., 2014) Rapidez, confiabilidade e baixo custo são as principais características almejadas, mas é difícil combina-las numa única metodologia. Ensaios enzimáticos com quantificação por espectrofotometria UV-Vis tem sido propostos como uma forma relativamente barata e rápida de seleção lipases de interesse biotecnológico (TENG; XU, 2007). Entretanto, a literatura levanta alguns questionamentos sobre a precisão destes ensaios. Metodologias mais robustas e precisas como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) frequentemente são necessárias para validar ou confirmar os resultados. Para avaliação da atividade

sintética enantiosseletiva, ainda é indispensável o uso instrumentação analítica sofisticada, como CG ou HPLC com coluna quiral.

Outro questão importante no campo da biocatálise é como preservar a vida útil da enzima. A imobilização enzimática possibilita a manutenção da atividade catalítica por mais tempo, além de facilitar a recuperação e reutilização do biocatalisador. Inúmeras estratégias têm sido propostas para a imobilização de enzimas extracelulares. Por outro lado, a biomassa fúngica, também chamada micélio, possui toda uma maquinaria enzimática própria. As enzimas ligadas ao micélio podem ser consideradas enzimas naturalmente imobilizadas, e têm uma óbvia atração de custo em comparação com o uso de enzimas livres ou solúveis em biotransformações. Isto se deve ao fato de que a biomassa fúngica pode ser usada como uma fonte direta da enzima, eliminando a necessidade de isolamento, procedimentos de extração, purificação e imobilização externa (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017; LOO et al., 2014; ZANOTTO et al., 2009).

Diante do panorama apresentando acima, o trabalho de pesquisa que compõe esta tese teve como objetivo geral:

- Selecionar, a partir de linhagens depositadas em coleções, fungos produtores de lipases com atividade enantiosseletiva em meio orgânico, avaliando seu potencial uso na obtenção de um fármaco enantiopuro.

Para tanto, esta pesquisa teve como objetivos específicos:

- Cultivar linhagens fúngicas pré-selecionadas em meio líquido específico para a indução da produção de lipase ligada à biomassa.
- Determinar a atividade hidrolítica de lipase ligada a biomassa utilizando uma metodologia analítica rápida e de baixo custo, baseada em espectrofotometria.
- Cultivar as linhagens em meio sem indutor de produção de lipase, para verificação da presença de lipases constitutivas ligadas ao micélio.
- Avaliar três tratamentos da biomassa (delipidada, não-delipidada e cultivada em meio sem indutor) quanto à a atividade hidrolítica de lipase.
- Desenvolver um método analítico baseado em CG-DIC para avaliar a atividade sintética de lipase numa reação de transesterificação em meio orgânico.
- Avaliar a atividade sintética em meio orgânico das lipases presentes na biomassa por meio de uma reação de transesterificação, quantificando o produto da reação por espectrofotometria e por CG-DIC.

- Comparar os resultados da quantificação da atividade sintética obtidos via espectrofotometria com os obtidos via CG-DIC, a fim de verificar a confiabilidade dos dados obtidos por espectrofotometria.
- Desenvolver um método analítico baseado em HPLC para avaliar a atividade enantiosseletiva de lipase numa reação de esterificação do (R,S)-ibuprofeno.
- Avaliar a capacidade das lipases ligadas ao micélio na resolução enantiosseletiva do (R,S)-ibuprofeno por um método baseado em HPLC.
- Identificar por técnicas moleculares as linhagens fúngicas que forneceram as lipases com melhores resultados na síntese e/ou resolução de compostos quirais.

A seção 2 desta tese consiste numa revisão bibliográfica sobre o campo da biocatálise, abordando sua origem e seus desenvolvimentos mais recentes. Consideramos a importância das enzimas e, em particular, das lipases para este campo. Abordamos as aplicações das atividades hidrolítica e sintética das lipases, bem como as metodologias propostas para tornar mais eficiente e preciso o seu processo de triagem. Discutimos brevemente o papel dos fungos como fornecedores de enzimas e a necessidade de valorizar as coleções micológicas como fontes potenciais de microrganismos para aplicações biotecnológicas. A seção 3 contém o artigo “*Avaliação da biomassa de fungos amazônicos como fonte de lipases para biocatálise*”, o qual resume os principais resultados obtidos durante o desenvolvimento desta tese. Na seção 4 apresentamos nossas conclusões e perspectivas sobre estes resultados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BIOCATÁLISE: CONCEITO, HISTÓRICO E DESENVOLVIMENTOS RECENTES

Biocatálise se refere ao uso de moléculas ou materiais biológicos para acelerar a taxa de processos químicos. Inclui o uso de enzimas de ocorrência natural, enzimas recombinantes, grupos de enzimas, extratos celulares, células inteiras e outras preparações derivadas da biomassa (TIMSON, 2019).

Biotransformação, no contexto da biotecnologia, tem sido definida como a modificação química de uma substância exógena por um sistema biológico (WANG; DAI, 2011). Neste estudo, os dois termos são empregados intercambiavelmente, seguindo a tendência observada na literatura (FABER, 2018; GRUNWALD, 2015; ILLANES, 2008; OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

A biocatálise empírica remonta a milênios, conforme documentado por antigos papiros egípcios que mencionam o emprego do que hoje conhecemos como leveduras na produção de pão e cerveja. Esse processo mais tarde veio a ser chamado “fermentação”. Foi somente nos últimos duzentos anos, porém, que floresceu a base científica para a compreensão deste processo e para o desenvolvimento da moderna biocatálise (BON; CORVO; FERRARA, 2008)

A catálise biológica foi inicialmente reconhecida e descrita no final do século 18 e começo do século 19. Por volta de 1850, o francês Louis Pasteur mostrou que as práticas artesanais para obtenção de produtos como vinho e vinagre estavam associadas à presença de microrganismos. Pasteur propôs que a fermentação alcoólica era catalisada por agentes que denominou “fermentos” (NELSON; COX, 2014). O cientista postulou que estes fermentos seriam inseparáveis da estrutura das células vivas da levedura. Em 1876, o alemão Wilhelh Kühne publicou um trabalho sobre fermentação no qual propôs o termo *énzyme* como nome genérico para fermentos que atuavam na ausência de organismos ou fora deles. Foi somente em 1897, por meio de experimentos com extratos de levedura, que outro cientista alemão, Edward Buchner, provou que as enzimas continuavam promovendo a fermentação alcoólica *mesmo quando removidas das células*. Pode-se considerar o experimento de Buchner como o marco inicial da enzimologia.

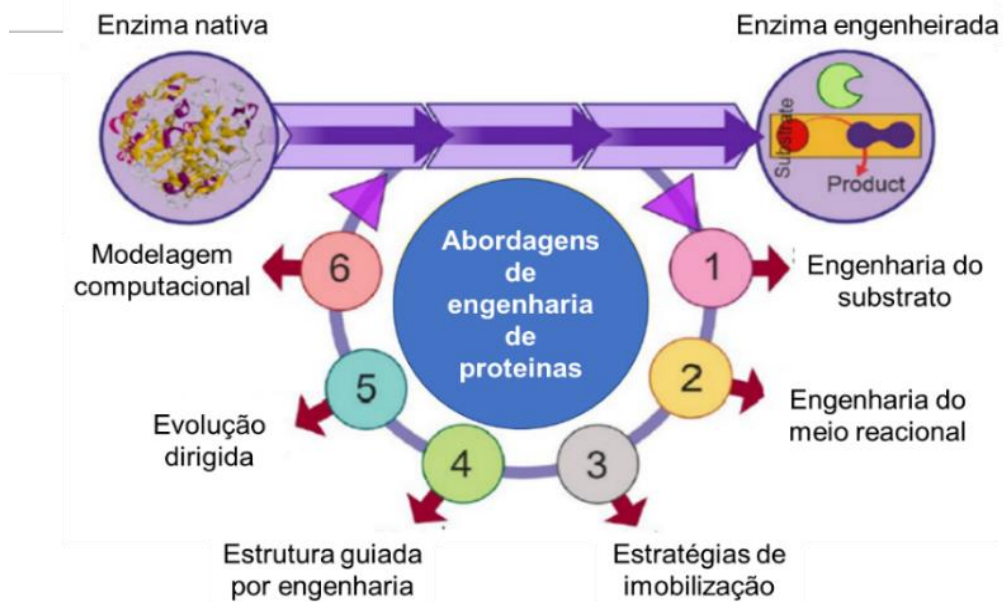
O trabalho de Buchner motivou muitos cientistas a tentar o isolamento de numerosas enzimas e a examinar suas propriedades catalíticas para processos químicos tradicionalmente conduzidos com catalisadores sintéticos (BON; CORVO; FERRARA, 2008; NELSON; COX, 2014). Porém, mesmo antes dos experimentos de Buchner, um desenvolvimento significativo no campo da biocatálise aconteceu em 1874, quando o químico dinamarquês Emil Hansen extraiu a renina (uma protease que atua sobre polipeptídios no leite) a partir de estômagos secos de bezerros. Esta foi, aparentemente, a primeira preparação enzimática minimamente purificada que foi usada com fins industriais - no caso, a produção de queijo (BON; CORVO; FERRARA, 2008). A biocatálise deixava de ser uma atividade empírica e passava a se fundamentar no conhecimento científico.

Bornscheuer *et al.* (2012), dividem a era da biocatálise moderna em três “ondas”. Durante a chamada “primeira onda da biocatálise”, que iniciou mais de um século atrás, os cientistas reconheceram que preparações ou extratos derivados das células vivas poderiam ser aplicadas em transformações químicas úteis - em contraste com os processos fermentativos empíricos, que já eram comuns há milênios. Além do emprego da renina na produção de queijos, outra aplicação representativa do início da “primeira onda” foi a utilização, a partir de 1908, da tripsina no tratamento do couro (BON; CORVO; FERRARA, 2008). Alguns exemplos mais recentes são o uso de proteases e lipases em detergentes para a roupa, o emprego da glicose-isomerase para converter glicose em frutose utilizada em adoçantes e a utilização da penicilina-G-acilase na produção de antibióticos semissintéticos (BORNSCHEUER *et al.*, 2012).

Durante a “segunda onda de biocatálise”, nas décadas de 1980 e 1990, o surgimento das tecnologias de engenharia de proteínas e o desenvolvimento da biocatálise em meios não-aquosos ampliaram a gama de substratos sobre os quais as enzimas poderiam atuar. Essa mudança expandiu a biocatálise para a fabricação de intermediários farmacêuticos e produtos químicos finos. Exemplos incluem a resolução catalisada por lipase de precursores quirais para síntese de diltiazem (um medicamento para pressão arterial), síntese de intermediários para herbicidas catalisada por hidroxinitrila-liase, síntese de álcoois enantiopuros catalisada por carbonil-redutase para produção de estatina (medicamento redutor do colesterol), entre inúmeros outros (BORNSCHEUER *et al.*, 2012; ZAKS; KLIBANOV, 1985).

A “terceira onda” da biocatálise começou com o trabalho de Stemmer e Arnold, em meados dos anos 1990. Eles foram pioneiros no desenvolvimento de métodos de biologia molecular que modificam biocatalisadores rápida e extensivamente por meio de uma versão *in vitro* da evolução darwiniana. Estes métodos são agora comumente chamados “evolução dirigida”, envolvendo ciclos iterativos de alterações aleatórias dos aminoácidos em uma proteína, obtendo-se assim uma “biblioteca” de variantes. Em seguida realiza-se a seleção para variantes com melhor estabilidade enzimática, especificidade de substrato e/ou enantioseletividade, conforme seja o objetivo perseguido. Por seu trabalho pioneiro com a “evolução dirigida” de enzimas, Frances Arnold foi uma das vencedoras do Prêmio Nobel de Química de 2018 (BORNSCHEUER et al., 2012; WOODLEY, 2019).

Ainda mais recentemente, Bornscheuer (2018) discutiu a emergente “quarta onda da biocatálise”, resultante da integração de conhecimentos e técnicas em biologia molecular, sequenciamento rápido e barato de genoma e, principalmente, bioinformática e modelagem computacional. De acordo com esse autor, *‘no passado, um processo baseado em enzimas era projetado em torno das limitações da enzima; hoje, a enzima é projetada para atender as especificações do processo’*.



Esquema 1 - Abordagens da engenharia de proteínas para desenvolver biocatalisadores

Fonte: BILAL e IQBAL (2019), adaptado

Conforme mostrado no Esquema 1, a “engenharia de proteínas” dispõe agora de todo um conjunto de recursos e estratégias para aperfeiçoar a performance das enzimas nativas e ajusta-las às necessidades dos processos biocatalíticos (BILAL; IQBAL, 2019; BORNSCHEUER, 2018).

As ferramentas desenvolvidas pela biologia sintética também estão impactando fortemente o campo da biocatálise, permitindo projetar não apenas enzimas isoladas, mas vias metabólicas completas, capazes de catalisar reações cada vez mais sofisticadas (BADENHORST; BORNSCHEUER, 2018). Por exemplo, Paddon e colaboradores desenvolveram uma metodologia para a produção em escala industrial de ácido artemisínico – um importante precursor do anti-malárico artemisinina - empregando *Saccharomyces cerevisiae* modificada por engenharia genética. A rota metabólica biossintética desenvolvida pelo grupo de Paddon se baseou em três reações consecutivas de bio-oxidação do amorfadieno, catalisadas por oxirredutases. O ácido artemisínico, produzido via *S. cerevisiae* geneticamente modificada, foi então convertido em artemisinina numa etapa química. Em 2016, 60 toneladas de artemisinina foram produzidas utilizando a metodologia desenvolvida por este grupo de pesquisa (GONÇALVES; FONSECA, 2018; PADDON; KEASLING, 2014).

Sem dúvida, a biocatálise é uma das tecnologias mais promissoras para a síntese sustentável de moléculas para fins farmacêuticos, biotecnológicos e industriais, e seu impacto econômico tem sido cada vez maior. Projeções indicam que o mercado global de enzimas deve aumentar de US \$ 7 bilhões para US \$ 10 bilhões até 2024 (ABDELRAHEEM et al., 2019).

Desde o uso empírico de “fermentos” até a emergente “quarta onda” da biocatálise, milhares de enzimas têm sido identificadas e muitas isoladas em sua forma pura. Em janeiro de 2020, de acordo com o sítio *Worldwide Protein Data Bank* (<http://www wwpdb.org/stats.html>), mais de 167 mil proteínas, incluindo enzimas, já tinham a sua exata sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional determinadas através de cristalografia de raios X e/ou RMN-2D<sup>3</sup>. O isolamento de enzimas e a investigação de suas propriedades contribuíram muito para o progresso da bioquímica. A compreensão dos aspectos gerais da estrutura e mecanismo de ação destas biomoléculas foi também fundamental para o desenvolvimento do campo da biocatálise.



### 2.1.1 Enzimas – aspectos gerais

De acordo com Nelson e Cox (2014), são duas as condições fundamentais para haver vida: primeiro, o organismo deve ser capaz de se autorreplicar; segundo - e não menos importante - ele deve ser capaz de catalisar reações químicas com eficiência e seletividade. A classe de biomoléculas que se ocupa em atender a esta segunda condição para a vida são as enzimas.

Com exceção das ribozimas - moléculas de RNA com propriedades catalíticas - todas as enzimas são proteínas, isto é, cadeias de aminoácidos que se organizam em estruturas tridimensionais bem definidas e únicas (NELSON; COX, 2014). Em 1954, o trabalho de Anfinsen demonstrou que a sequência de aminoácidos de uma proteína possui toda a informação necessária ao dobramento da proteína em sua estrutura tridimensional nativa, funcional (BON; CORVO; FERRARA, 2008). De um modo ainda não inteiramente compreendido, a sequência de aminoácidos - também chamada de estrutura primária - determina como a cadeia se enovela, formando uma estrutura tridimensional singular para cada proteína em particular - a estrutura terciária (TIMSON, 2019). Muitas enzimas apresentam também estrutura quaternária, ou seja, a associação de subunidades de polipeptídeos, formando oligômeros.

No seu papel de biocatalisadores, as enzimas atuam diminuindo a energia de ativação de uma reação específica e, dessa forma, aumentam a velocidade da reação sem afetar o equilíbrio desta. Entretanto, as enzimas são tão extraordinariamente efetivas como catalisadores que podem aumentar a velocidade das reações entre 5 e 17 ordens de magnitude (TIMSON, 2019). A característica que distingue uma reação catalisada enzimaticamente é que ela acontece sempre no interior de uma cavidade da enzima denominada de sítio ativo. A molécula que se liga ao sítio ativo e sofre a ação da enzima é chamada substrato. A superfície do centro ativo é contornada com resíduos de aminoácidos cujos grupos substituintes se ligam ao substrato, formando o complexo enzima-substrato (ES). Na sequência, o substrato é transformado no produto de interesse para o organismo (NELSON; COX, 2014).

No início do século XX, a hipótese de Fischer, conhecida também como modelo da “chave e fechadura”, foi a primeira proposta teórica para explicar o poder catalítico das enzimas. De acordo com este modelo, haveria uma complementaridade precisa entre o sítio ativo da enzima e seu substrato. Assim surgiu a ideia de “uma

enzima, um substrato, uma reação” – ou seja, para cada reação catalisada por uma enzima haveria apenas um substrato possível.

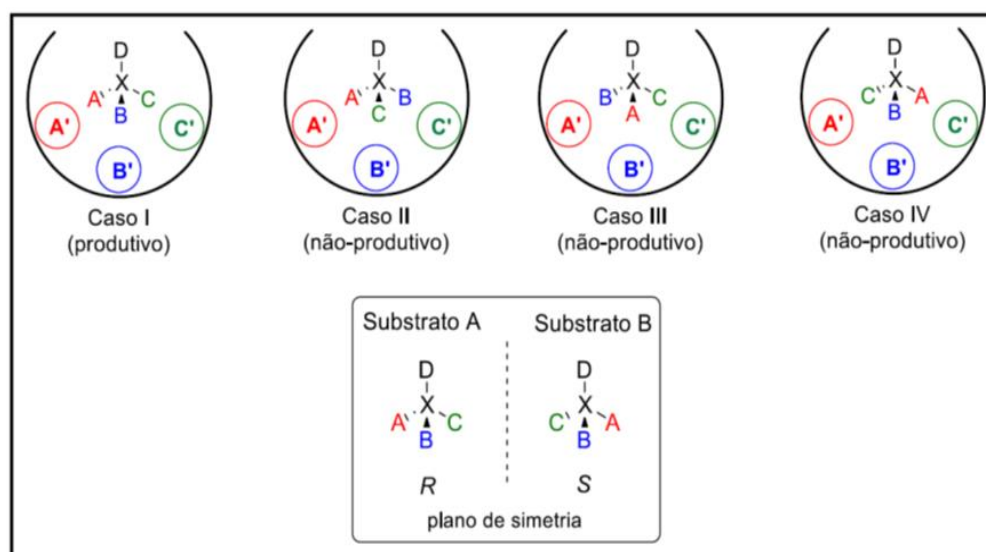
Um dos problemas do modelo “chave e fechadura” era que este não conseguia explicar a “promiscuidade enzimática”, ou seja, o fato de algumas enzimas não serem totalmente específicas a substratos naturais e poderem catalisar outros tipos de reações envolvendo substratos não naturais, incomuns a elas (FERREIRA, 2016). O modelo de Fischer foi mais tarde ampliado por Haldane, o qual deduziu que o substrato não “encaixa” exatamente na enzima, mas sofre uma distorção após a formação do complexo enzima-substrato. Posteriormente, com o desenvolvimento da ideia de “estado de transição” para as reações químicas, Pauling propôs que a enzima se liga mais fortemente ao estado de transição que ao substrato (ARANTES, 2008).

Desenvolvendo ainda mais as ideias de Pauling, Koshland propôs o modelo do “ajuste induzido”. O modelo de Koshland propõe que, através da complexação, o substrato induz uma mudança conformacional na subunidade da enzima com a qual interage. Esta mudança pode ser transmitida às subunidades vizinhas, induzindo na enzima a conformação responsável pelo processo catalítico. Em outras palavras, o modelo do ajuste induzido considera a capacidade do substrato de selecionar ou induzir a modificação da estrutura tridimensional da enzima, ao mesmo tempo em que a enzima tem a propriedade de reconhecer uma ou um conjunto de conformações do(s) substrato(s). Este último, ao acarretar uma mudança conformacional de seu receptor, pode estar induzindo-o a adotar a conformação responsável por seu reconhecimento (VERLI; BARREIRO, 2005).

Conforme o tipo de transformação que realizam sobre o(s) substrato(s) em meio aquoso, as enzimas são agrupadas pela Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em seis classes principais. Cada uma destas classes admite três níveis de subclasses, de tal modo que o nome sistemático de uma enzima é uma seqüência de quatro dígitos. Exemplificando, o nome formal da lipase é EC 3.1.1.3, indicando que se trata de uma hidrolase (3) que quebra ligações do tipo éster (1) originando ácidos carboxílicos (1) ao agir sobre triacilgliceróis na interface água/óleo (3) (NELSON; COX, 2014).

Além da extraordinária efetividade na aceleração das reações, as enzimas são notáveis por sua especificidade estereoquímica. A teoria dos três pontos, proposta por Ogston em 1948, é amplamente usada para explicar a enantiosseletividade das

enzimas. Para que seja possível discriminar entre seus enantiômeros, um substrato quiral deve ficar preso no espaço em três dimensões. As enzimas devem ter, portanto, pelo menos três pontos de ataque ao substrato no sítio ativo. Sendo assim, a formação do complexo ES só é possível para um dos enantiômeros, com a configuração correta definida no sítio ativo pelos três pontos diferentes de interação. Os resíduos de aminoácidos da enzimas que interagem com o substrato nestes três pontos compõe a chamada “tríade catalítica” (FERREIRA, 2016). Por exemplo, de acordo com o Esquema 2, somente o substrato A atende à regra dos três pontos.



Esquema 2 - Capacidade enzimática de discriminar entre enantiômeros, de acordo com a teoria dos três pontos de Ogston. Fonte: FERREIRA (2016)

Em razão do papel fundamental que a água apresenta para a manutenção da atividade enzimática nos seres vivos, com o tempo surgiu a noção de que, fora do ambiente aquoso, uma enzima teria sua conformação nativa drasticamente distorcida e se tornaria inativa. Segundo esta noção, o uso de enzimas em meio orgânico – o qual é o mais utilizado para as reações de síntese química – seria inviável. A refutação de tal conceito abriu oportunidades totalmente novas para o emprego da biocatálise em processos produtivos (ZACKS e KLIBANOV, 1985).

### 2.1.2 Enzimas em meio orgânico

Embora as enzimas tenham sido usadas em escala industrial há mais de 100 anos, a plena aceitação de sua utilidade em biocatálise sintética foi bem mais

recente (BON; CORVO; FERRARA, 2008) A idéia de que somente o meio aquoso era propício para manter a conformação cataliticamente ativa restringia o uso de enzimas em síntese orgânica, pois os substratos empregados em reações sintéticas são frequentemente hidrofóbicos (SHELDON; BRADY, 2019). Outra desvantagem da utilização do meio aquoso para síntese orgânica é a ocorrência de reações laterais como hidrólise, racemização e polimerização. Ainda mais, a remoção da água, para recuperação dos produtos da reação, é lenta e onerosa devido ao seu alto ponto de ebulição e grande calor de vaporização. (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; GHANEM, 2007)

Os trabalhos de Zacks e Klibanov, em meados dos anos 1980, demonstraram conclusivamente que enzimas podem ser ativas em meio orgânico, em condições microaquosas (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). O raciocínio empregado por estes pesquisadores foi notavelmente simples e persuasivo: a questão real não é se a água é necessária para o funcionamento da enzima, mas *de quanta* água ela precisa. Uma molécula de enzima provavelmente só interage com apenas poucas camadas de átomos de água imediatamente à sua volta. Assim, existe uma camada de solvatação, que contribui para a manutenção da sua conformação cataliticamente ativa, e a enzima não seria forçosamente inativada se todo o restante da água fosse substituído por um solvente orgânico. Experimentos com lipases de três diferentes fontes confirmaram este raciocínio (ZACKS e KLIBANOV, 1985).

Acredita-se atualmente que as enzimas sejam cataliticamente ativas em meio orgânico porque permanecem em sua conformação nativa, sem sofrer dobramentos adicionais. Este fenômeno é explicável em parte devido ao aumento das interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da enzima em solventes orgânicos, bem como à baixa constante dielétrica da maioria destes solventes. O aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares em condições microaquosas é provavelmente outro fator estabilizante da conformação da enzima (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Mais recentemente, houve um aumento exponencial do interesse na área de biotransformação. Métodos de biotransformação que utilizam enzimas em solventes orgânicos são atualmente bem conhecidos, e bastante úteis em síntese orgânica. A biocatálise amadureceu o bastante para se tornar um padrão tecnológico, fato que se reflete no número de processos de biotransformação

funcionando em escala industrial (SHELDON; BRADY, 2019; WOODLEY, 2019). Este número tende a aumentar, ao passo que as vantagens do emprego de enzimas são cada vez mais reconhecidas e suas limitações para aplicação em grande escala vêm sendo superadas.

### 2.1.3 *Vantagens e limitações*

A utilização de enzimas em síntese orgânica tem vantagens importantes em relação a muitas reações da química orgânica tradicional. Catalisadores químicos são pouco versáteis e requerem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuindo baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista ou contaminada, que requerem uma etapa posterior de purificação. O emprego de catalisadores, reagentes e solventes químicos de elevada toxicidade gera resíduos difíceis de reciclar, comprometendo a sustentabilidade do processo. Em contraste, as enzimas foram projetadas para atuar como catalisadores nas condições brandas existentes no interior dos seres vivos (cerca de 37°C, 1 atm de pressão e pH em torno de 7,0), com excelente balanço energia/eficiência (ABDELRAHEEM et al., 2019; NAIK et al., 2010).

A mais importante vantagem do uso das enzimas como biocatalisadores é a sua inigualável seletividade. Elas são capazes de atuar sobre um grupo funcional específico, discriminando-o dentre outros presentes no substrato, levando a produtos reacionalmente mais “limpos” (quimiosseletividade); podem distinguir entre grupos funcionalmente idênticos que estão na mesma molécula, mas em diferentes posições, agindo preferencialmente sobre um deles (regiosseletividade); em uma mistura racêmica, reconhecem a diferença na orientação espacial dos átomos dos enantiômeros e catalisam reações preferencialmente com um deles em detrimento do outro (enantiosseletividade) (KOURIST; HOLLMANN; NGUYEN, 2014; MOORE; BORNSCHEUER, 2014).

Esta refinada especificidade das enzimas vem ao encontro de um dos pilares da chamada “química verde”: o princípio da “economia atômica”: a reação ideal é aquela em que toda a massa dos reagentes é incorporada ao produto. As vantagens desta reação seriam a menor geração de resíduos e a utilização mais efetiva das matérias-primas. Além do evidente ganho em termos ambientais, economia atômica significa, do ponto de vista empresarial, aumentar a eficiência do

processo e diminuir custos com separação, purificação e tratamento de resíduos (SHELDON; BRADY, 2019).

É preciso reconhecer, porém, que desenvolver um processo biocatalítico economicamente viável em escala industrial requer a superação de consideráveis obstáculos técnicos. A estabilidade do biocatalisador, ou seja, a capacidade de reter sua atividade através do tempo, é indubitavelmente o fator limitante na maioria dos bioprocessos. Enzimas são moléculas inerentemente lábeis - uma mudança conformacional de menos de um Angstrom pode causar um declínio abrupto de sua atividade. Sendo geralmente proteínas de alto peso molecular, elas tendem a ser sensíveis à temperatura, pH, oxidação, agitação mecânica e, em sistemas multienzimáticos, ao ataque de outras enzimas, como proteases. Em meio aquoso, elas comumente mantêm sua conformação ativa em uma faixa estreita de temperatura e pH, e oscilações para além desta faixa resultam na sua inativação. Muitas enzimas são também suscetíveis à inibição por excesso de produto ou de substrato (BON; CORVO; FERRARA, 2008; RUDROFF et al., 2018)

O problema da estabilidade das enzimas empregadas em bioprocessos tem sido abordado sob diversas perspectivas. Uma delas é a estabilização operacional do biocatalisador. Várias estratégias tem sido desenvolvidas para aumentar a estabilidade operacional: uso de aditivos estabilizantes, derivatização, modificação química da estrutura enzimática, cristalização, engenharia do meio reacional e imobilização são algumas das estratégias citadas na literatura. Destas, a imobilização é talvez a mais usada (RUDROFF et al., 2018)

Imobilizar uma enzima significa aderi-la a algum tipo de suporte insolúvel (géis ou membranas poliméricos, microcápsulas etc). O uso de enzimas puras, não-imobilizadas, pode ser dispendioso, e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, a sua recuperação do meio reacional pode ser difícil. A fim de evitar a perda de sua eficiência no decorrer do processo e/ou facilitar sua recuperação e reutilização ao final deste, enzimas isoladas são frequentemente imobilizadas (SHELDON; BRADY, 2019). Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Entretanto, têm sido verificado que o processo de imobilização pode aumentar ou diminuir a atividade e a estabilidade da enzima. Mesmo quando bem-sucedida, a imobilização é sempre um passo adicional que também onera o emprego do biocatalisador, pois é preciso considerar o custo do

material usado como suporte (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2019)

Uma alternativa para contornar estas limitações é o uso de enzimas ligadas à célula ou micélio. Elas atuam no meio extracelular, sendo consideradas enzimas naturalmente imobilizadas. Seu emprego permite o uso direto da biomassa, eliminando assim a necessidade de procedimentos de isolamento, purificação e imobilização, os quais encarecem significativamente a utilização do biocatalisador. Vários trabalhos na literatura têm focado a procura de microrganismos com lipases ligadas à célula, refletindo a importância desta subclasse de enzimas hidrolíticas para o campo da biocatálise (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017; LIMA et al., 2019; ZHANG et al., 2012; ZHENG et al., 2014)

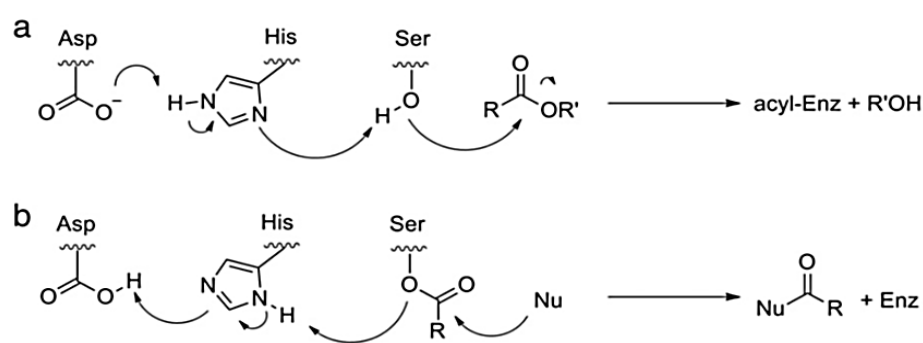
## 2.2 LIPASES

### 2.2.1 *Classificação e estrutura*

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas na superfamília das  $\alpha/\beta$ -hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, quando em meio aquoso. Esta reação hidrolítica pode ser revertida sob condições micro-aquosas, como em solventes orgânicos, levando a reações de síntese de ésteres ou transesterificações (GUPTA et al., 2015). Muitos autores consideram as lipases um tipo especial de esterases (EC 3.1.1) (FERRER et al., 2016; KOURIST; HOLLMANN; NGUYEN, 2014). Lipases são amplamente encontradas em animais, plantas e microrganismos. (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Para discriminar entre esterases genéricas (EC 3.1.1) e as “verdadeiras” lipases (EC 3.1.1.3), o critério mais aplicado atualmente é o tamanho da cadeia acila do substrato. As lipases verdadeiras tem preferência em catalisar a hidrólise de ácidos graxos de cadeia longa (> 10 carbonos), enquanto as esterases tem preferência por ligações de ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia curta (< 10 carbonos (FERRER et al., 2016; SPERB et al., 2015)

A elucidação das estruturas tridimensionais de algumas lipases possibilitou uma maior compreensão com relação ao mecanismo de ação destas enzimas. Os resíduos catalíticos essenciais à atividade enzimática variam entre as espécies, sendo os mais frequentes formados pelas tríades SER-GLU-HIS e SER-ASP-HIS. O

resíduo de serina do sítio catalítico encontra-se localizado na volta entre uma  $\alpha$ -hélice e uma folha  $\beta$ , sendo conhecido como “cotovelo” nucleofílico (ANOBOM et al., 2014; GUPTA et al., 2015). No sítio catalítico das serina-hidrolases, a reação ocorre através de um mecanismo *bi-bi ping-pong* e um ataque nucleofílico no grupo carbonila promovido por uma serina, uma histidina e um resíduo de aspartato (também conhecido como "tríade catalítica"). O intermediário "enzima-acil" resultante pode, por sua vez, reagir com um nucleófilo, como água, álcoois ou aminas, regenerando a enzima (Figura 3) (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017; DE MIRANDA; MIRANDA; DE SOUZA, 2015) .



Esquema 3 - Etapas do mecanismo catalítico da lipase: formação do intermediário acil-enzima [reação a]; formação do produto e regeneração da enzima [reação b]. Fonte: (DE MIRANDA; MIRANDA; DE SOUZA, 2015)

### 2.2.2 Aplicações biotecnológicas e métodos de triagem da atividade hidrolítica de lipases

O campo de aplicação mais importante para a atividade hidrolítica das lipases ainda é o seu uso como aditivo em detergentes, tanto domésticos como industriais. Entretanto, a capacidade hidrolítica das lipases também tem encontrado aplicações interessantes em vários outros campos, como, por exemplo, o uso de lipases no tratamento de efluentes e na processamento/melhoramento nutricional de alimentos (ANOBOM et al., 2014; DAIHA et al., 2015).

Diversos métodos têm sido propostos para detectar e mensurar a atividade hidrolítica de lipase de microrganismos (BEISSON; RIVIÈRE, 2000; HASAN; SHAH; HAMEED, 2009). Um dos mais utilizados é a titulometria de neutralização de reações de hidrólise do óleo de oliva (GUTARRA et al., 2009). Outra metodologia amplamente



utilizada é a quantificação por espectrofotometria do *p*-nitrofenol liberado na hidrólise de palmitato de *p*-nitrofenila emulsificado em solução aquosa (GEOFFRY; ACHUR, 2017).

Embora – como será discutido na próxima seção - não haja uma relação direta entre as atividades hidrolítica e sintética de uma lipase, trabalhos de triagem da atividade sintética frequentemente incluem também ensaios preliminares de atividade hidrolítica. A comparação entre as duas atividades permite distinguir entre microrganismos que produzem mais lipase do que outros – e por isso apresentam atividade hidrolítica/sintética comparativamente alta - e microrganismos que efetivamente produzem lipases com alta atividade sintética, ainda que apresentando atividade hidrolítica relativamente baixa.

### *2.2.3 Aplicações biotecnológicas e métodos de triagem da atividade sintética de lipases*

A atividade sintética das lipases em meios não-aquosos tem sido cada vez mais empregada em processos biotecnológicos. (ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016). Em anos recentes, atenção especial tem sido dada ao uso de lipases como biocatalisadores na síntese de biodiesel. O biodiesel é um combustível líquido composto por monoalquil ésteres e pode ser obtido por transesterificação biocatalisada. Os processos alcalinos convencionais de produção deste combustível geram subprodutos indesejáveis, dificultam a separação entre o catalisador e o subproduto glicerol, produzem resíduos altamente alcalinos e usam matérias-primas de alto custo.

Diversas lipases, de diferentes microrganismos, têm exibido capacidade de catalisar em meios orgânicos (ou outros tipos de ambientes não-aquosos, como líquidos iônicos e sistemas reacionais sem solvente) a transesterificação de triacilgliceróis e a esterificação de ácidos graxos livres para produzir ésteres monoalquílicos. Elas têm demonstrado atividade catalítica frente a óleos de diferentes origens, mesmo alguns destes possuindo elevados teores de acidez ou de água. Além disso, no processo enzimático a separação do subproduto glicerol é facilitada. A produção enzimática de biodiesel já foi realizada usando lipases extracelulares e intracelulares, bem como matérias-primas de baixo custo, tais como gordura animal,

óleo vegetal, óleo de cozinha reusado e resíduos ácidos da produção de óleos vegetais (ANOBOM et al., 2014; GUERRAND, 2017).

Entretanto, nem todas as lipases podem catalisar estas reações. Assim, é preciso selecionar enzimas adequadas para tais procedimentos. A triagem de um catalisador “ótimo” para reações em meios não-aquosos torna-se assim um passo crucial. A maioria dos métodos de triagem de alto desempenho de lipases se baseia em ensaios de atividade hidrolítica. Alguns trabalhos, porém, demonstram que não há correspondência entre a atividade hidrolítica de lipase em meio aquoso e a atividade sintética desta enzima em solventes orgânicos. A atividade hidrolítica detectada em ensaios realizados em meio aquoso é de pouco valor em prever a atividade sintética. Em alguns casos, uma lipase pode exibir alta atividade hidrolítica e não ter atividade de síntese significativa (TORRES et al., 2003; WU; JÄÄSKELÄINEN; LINKO, 1996; ZANOTTO et al., 2009)

Com o objetivo de avaliar especificamente a atividade sintética de lipase, vários ensaios baseados na atividade de esterificação e de transesterificação têm sido propostos. A maioria destes ensaios são baseados em cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, também conhecida como High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ou em determinações titulométricas. Como exemplo, Torres et al. (2003) utilizaram a esterificação de ácido oléico e propanol em oleato de propila, como ensaio para detecção de atividade sintética de lipases ligadas ao micélio de fungos endofíticos. Alíquotas foram retiradas após 3 h e o oleato de pentila foi quantificado por CG. Lisboa (2006) adaptou a metodologia proposta por Torres et al.(2003), utilizando pentanol – o qual é menos volátil que o propanol - na esterificação do ácido oléico, aumentando o tempo de monitoramento da reação para até 72 hs. A quantificação do oleato de pentila foi feita por RMN-1H (LISBÔA, 2006).

Idealmente, um ensaio enzimático deve ser simples, de baixo custo e de alta confiabilidade (baixa ocorrência de falsos-positivos ou falsos-negativos). Métodos baseados em CG e HPLC são altamente precisos e confiáveis, mas requerem insumos de alta pureza e instrumentação cara. Determinações titulométricas são relativamente mais acessíveis em termos de custos, mas tem o inconveniente de serem bastante demoradas para serem aplicadas na triagem de um grande número de enzimas/microrganismos (BEISSON; RIVIÈRE, 2000; SANDOVAL; MARTY, 2007).

A fim de obter um ensaio de atividade sintética para lipases que fosse ao mesmo tempo específico, rápido e econômico, Teng e Xu (2007) modificaram o ensaio proposto inicialmente por Pencreach e Baratti, o qual utilizava palmitato de *p*-nitrofenila (pNPP) como substrato para determinar a atividade hidrolítica de lipase em meio orgânico. A reformulação proposta por Teng e Xu foi baseada em reações de transesterificação catalisadas por lipases entre pNPP e etanol usando *n*-heptano como solvente, obtendo como produtos *p*-nitrofenol (pNP) e palmitato de etila. O passo crucial adicionado por Teng e Xu à metodologia de Penchreach e Baratti foi a extração de uma pequena quantidade da fase orgânica onde aconteceu a reação biocatalisada para uma fase aquosa alcalina. O rendimento de pNP pôde assim ser facilmente detectado pela absorbância da fase aquosa alcalina num espectrofotômetro UV-Vis e então usado como indicador para determinação da atividade sintética (produção de palmitato de etila). Além de lipases obtidas comercialmente, Teng e Xu utilizaram também lipases ligadas ao micélio de 30 linhagens mutantes de *Rhizopus chinensis* preparadas em seu laboratório.

Visto que transesterificações e esterificações são duas reações tipicamente usadas para avaliar a atividade sintética de lipases em meio orgânico, Teng e Xu testaram as mesmas 30 linhagens em um ensaio de esterificação entre ácido palmítico e etanol. O rendimento de palmitato de etila foi quantificado por titulometria. Quando o percentual de conversão a palmitato de etila dos dois ensaios (transesterificação x esterificação) foi comparado, verificou-se um índice de correlação razoável entre ambos ( $r^2 = 0,8287$ ). Assim, Teng e Xu concluíram que o seu ensaio baseado na reação de transesterificação entre pNPP e etanol, com quantificação do produto feita por espectrofotometria de UV, pode ser usado para avaliar a atividade sintética de lipase em meio orgânico.

Estes autores admitiram, porém que algumas dificuldades relativas à especificidade do substrato e à precisão de medição ainda permaneciam (TENG; XU, 2007). Por outro lado, caso essas dificuldades apontadas possam ser superadas ou possa ser demonstrado que elas não interferem significativamente na confiabilidade do ensaio, a proposta de Teng e Xu realmente seria uma promissora metodologia de triagem de larga escala de lipases com atividade sintética. A crescente acessibilidade dos espectrofotômetros com leitor de microplaca, que permitem a avaliação de dezenas ou até centenas de amostras simultaneamente, torna ainda mais interessante o desenvolvimento de ensaios de triagem enzimática

baseados na detecção da absorbância na faixa UV-Vis, como o proposto por estes autores.

Um modo de avaliar a confiabilidade do ensaio de Teng e Xu seria a detecção do palmitato de etila – o éster transesterificado que cuja formação é prevista na reação utilizada por aqueles autores em seu ensaio. A síntese de um éster em meio orgânico a partir de um ácido carboxílico de cadeia longa (como o ácido palmítico liberado na alcoólise do pNPP) e de um álcool é uma reação típica de lipases (WU; JÄÄSKELÄINEN; LINKO, 1996; ZAKS; KLIBANOV, 1985). Ela não é catalisada por esterases ou proteases, nem ocorre espontaneamente nas condições do ensaio de Teng e Xu. A detecção do palmitato de etila poderia ser feita via CG ou HPLC.

#### 2.2.4 Aplicações biotecnológicas da atividade sintética enantiosseletiva

A síntese de blocos de construção enantiopuros é uma importante tarefa para a indústria farmacêutica, e a principal razão para a notável expansão do campo da biocatálise neste setor, com as lipases à frente deste desenvolvimento (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017). A quiralidade é um fator chave na eficácia de muitas drogas. Diversos estudos demonstraram que a atividade farmacológica de drogas racêmicas encontra-se principalmente em um dos enantiômeros (eutômero), enquanto o outro (distômero) pode interagir com diferentes receptores, promovendo efeitos colaterais. Como exemplo, os profenos (ácidos 2-aril-propionicos) são um importante grupo de antiinflamatórios não-esteroidais, que apresentam atividade farmacológica principalmente na forma de (*S*)-enantiômero. Membros importantes desta família são o ibuprofeno, o cetoprofeno e o naproxeno. Estudos indicam que a forma *S* do naproxeno é 28 vezes mais ativa que a forma *R*. No caso do ibuprofeno, há trabalhos na literatura farmacológica indicando que o (*S*)-enantiômero é 160 vezes mais ativo na síntese *in vitro* de prostaglandina do que o (*R*)-enantiômero correspondente (JOSÉ; TOLEDO; BRIAND, 2015)

Devido a relevância deste tópico, muitos trabalhos na literatura tem abordado a resolução cinética enzimática do ibuprofeno, utilizando lipases comerciais purificadas, lipases nativas, lipases geneticamente modificadas, bem como diversas estratégias reacionais (CARVALHO et al., 2006; CASTILLO; VALDEZ; FARIÑA, 2015; COSTA; DE AMORIM, 1999; GANDOMKAR et al., 2015; GÉRARD et al., 2017;

GHANEM et al., 2010; JOSÉ; TOLEDO; BRIAND, 2015; ROMANO et al., 2005; SIODMIAK; RUMINSKI; MARSZALL, 2012; YOUSEFI; MOHAMMADI; HABIBI, 2014). Dentre estes trabalhos, chamou nossa atenção a proposta de Carvalho et al. (2006), pela relativa simplicidade e baixo custo de execução. Estes autores utilizaram a lipase liofilizada de *Aspergillus niger* para a resolução do (*R,S*)-ibuprofeno com 1-propanol em meio orgânico (isooctano). Os percentuais de conversão (*c*), de excesso enantiomérico do produto (*ee<sub>p</sub>*) e a razão enantiomérica (*E*) foram obtidos via análises por CG-DIC e HPLC, utilizando-se colunas quirais em ambas as técnicas. Embora os valores de excesso enantiomérico de (*S*)-ibuprofeno obtidos pelo grupo de Carvalho tenham sido baixos (*ee* = 6,1%), acredita-se que o aumento da oferta de novas lipases pode contribuir para a resolução enantiomérica deste e de outros importantes compostos de interesse farmacológico.

Dentre as lipases disponíveis comercialmente e aplicadas em processos industriais, várias foram originalmente isoladas de fungos tais como *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* (KOUTINAS et al., 2018). A bioprospecção deste grupo de organismos continua sendo uma fonte de novas enzimas empregáveis em biocatálise, realçando a importância dos fungos para a biotecnologia.

## 2.3 FUNGOS

Fungos são seres eucarióticos heterotróficos classificados pelos biólogos modernos em um reino próprio, o Reino *Fungi*, baseado sobretudo no seu modo de nutrição absorptivo. Os fungos secretam uma ampla gama de poderosas enzimas em seu ambiente e então absorvem estes nutrientes “pré-digeridos” para o interior de suas células. A diversidade dos fungos abrange desde bolores e leveduras microscópicos até cogumelos e trufas macroscópicos. Diferentemente dos outros eucariotos heterotróficos, os fungos apresentam uma parede celular quitinosa envolvendo a membrana plasmática (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Embora no passado a micologia tenha sido considerada um ramo da botânica, a evidência indica que os fungos estão filogeneticamente mais próximos dos animais do que das plantas. Constituem um grupo muito grande e heterogêneo,

encontrado virtualmente em qualquer nicho ecológico (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Os fungos podem apresentar seu soma (fase vegetativa) na forma de duas unidades básicas: a leveduriforme e a hifal. Nos fungos leveduriformes tem-se células únicas, delimitadas e pequenas, ao contrário das hifas que são células extremamente polarizadas, na forma de tubos que continuamente estendem-se em suas extremidades. O conjunto de hifas é denominado micélio, que a olho nu visualiza-se como um emaranhado de fios delgados (filamentos), coloridos ou não, dependendo da espécie (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; TEIXEIRA et al., 2011). No caso de fungos filamentosos, micélio e biomassa fúngica são por vezes usados como sinônimos (MANTOVANI et al., 2012)

Os fungos filamentosos sintetizam uma variedade de enzimas hidrolíticas. Várias espécies deles são usadas para a produção de enzimas industrialmente importantes, tais como proteases, carboidrases e lipases. Estes fungos têm um grande potencial para produzir muitos tipos de lipase extracelular, as quais são geralmente usadas como enzimas purificadas (MAROTTI et al., 2017). Entretanto, muitas das aplicações práticas destas lipases fúngicas extracelulares são limitadas por desvantagens econômicas causadas por complexos processos de purificação e por sua labelidade.

Por outro lado, desde o final da década de 1970, alguns pesquisadores vêm postulando a presença de enzimas funcionalmente relevantes, tanto sintéticas quanto hidrolíticas, associadas à parede celular dos fungos, denominadas por Rast *et al.* (2003) como enzimas associadas à parede (*wall-associated enzymes*, WAEs). A princípio acreditava-se que enzimas detectadas na parede celular eram simplesmente enzimas em rota de secreção para o meio, ou então meros artefatos devido à ruptura da célula. Entretanto, trabalhos testando a atividade catalítica direta de frações de paredes celulares fúngicas relataram a existência de WAEs pertencentes às classes bioquímicas oxidorreductase, hidrolase e transferase (RAST et al., 2003).

Os mecanismos que regulam a biossíntese de lipases ligadas ao micélio variam bastante entre os fungos. No caso de alguns, a produção de lipase parece ser constitutiva, ou seja, independente da adição de substratos lipídicos no meio de cultivo. Entretanto, sua presença pode aumentar o nível de atividade lipolítica. Por outro lado, há fungos que preferem algum óleo como indutor do que fontes de carbono

simples como açúcares, para a produção da enzima. Assim, as fontes de carbono lipídicas podem ser consideradas essenciais para a obtenção de um alto rendimento em lipase ligada à biomassa. Fontes de nitrogênio e micronutrientes também devem ser considerados para o crescimento microbiano e a otimização da produção da enzima (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017; SUN; XU, 2009) .

A atividade de lipases ligadas à biomassa fúngica pode ser diretamente explorada tanto para a síntese quanto para a hidrólise de ésteres. Para as lipases naturalmente ligadas, a estrutura da célula pode atuar como uma matriz natural capaz de proteger as enzimas da possível ação negativa de agentes externos, propiciando um efeito análogo àquele exercido por uma matriz comum usada para a imobilização de enzimas purificadas, ou seja, a minimização da perda da atividade. Ademais, lipases ligadas à célula são mais estáveis em solventes orgânicos (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017)

Taxonomicamente, os integrantes do Reino Fungi são agrupados em quatro grandes Divisões ou Filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota ou Basidiomycota (TEIXEIRA et al., 2011). Há ainda outras formas não-taxonômicas de agrupar os fungos, como, por exemplo, segundo o nicho ecológico que ocupam ou tipo de interação com o organismo hospedeiro. Surgem assim agrupamentos como endofíticos, fitopatogênicos e degradadores de madeira.

Zanotto e cols (2009) avaliaram fungos endofíticos, fitopatogênicos e degradadores de madeira da região amazônica como potenciais fornecedores de lipases ligadas a biomassa . Estes podem vir a ser uma promissora fonte de novas enzimas para aplicações em biocatálise (ZANOTTO et al., 2009)

### 2.3.1 Fungos Endofíticos

Fungos endofíticos são capazes de colonizar o interior de tecidos saudáveis de uma planta, em algum tempo do seu ciclo de vida, sem lhe causar aparentes sintomas de doença (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; WANG; DAI, 2011). Esses fungos estabelecem uma relação mutualística com seus hospedeiros, atuando como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos por meio de competição por nutrientes, produção de substâncias antagônicas, parasitando o patógeno ou induzindo a planta a desenvolver resistências aos patógenos . O fato de que muitos fungos endofíticos produzem metabólitos capazes de inibir o desenvolvimento de

patógenos e/ou pragas, e de apresentarem propriedades medicinais despertou o interesse de vários laboratórios pela identificação desses compostos . Alguns autores tem descritos os fungos endofíticos como “uma fonte inexplorada de biocatalisadores” (SURYANARAYANAN et al., 2012; WANG; DAI, 2011).

### 2.3.2 Fungos fitopatogênicos

No curso da evolução, uma grande variedade de fungos encontrou nos vegetais vascularizados condições para o seu desenvolvimento, utilizando-os como hospedeiros. Para tanto, os fungos tiveram que superar a formidável barreira da parede celular e sua altíssima recalcitrância. Através das gerações, estes organismos desenvolveram diferentes mecanismos de degradação do material da parede celular e lignina, incluindo um verdadeiro arsenal de enzimas com distintos padrões de secreção que podem ser úteis a diversas aplicações biotecnológicas. Por exemplo, o gênero *Erwinia* spp., que causa doenças de podridão mole, produz um amplo espectro de lipases e cutinases para degradar a cutícula hospedeira (HÉMATY; CHERK; SOMERVILLE, 2009). Um extenso trabalho de análise proteômica de *F. verticilloides* identificou 166 proteínas que incluíam enzimas que atuam na pectina e nas hemiceluloses, para degradação da parede celular vegetal (GUERRIERO et al., 2015) .

### 2.3.3 Macrofungos degradadores de madeira

Os macrofungos são vitais para a manutenção da vida na Terra, principalmente devido à sua capacidade de biodegradar matéria orgânica, como todos os componentes da madeira. Ascomicetos e basidiomicetos são dois dos grupos de macrofungos mais diversificados e extremamente numerosos que foram intensamente investigados em vários aspectos. A exploração da atividade enzimática destes macrofungos é uma das tendências importantes para entender suas características fisiológicas e bioquímicas e para esclarecer um potencial promissor considerável para aplicações industriais e biotecnológicas (KRUPODOROVA, 2014).

A importância das enzimas dos macrofungos vai além da capacidade de degradar o material lignocelulósico. Macrofungos selvagens são fontes de diferentes



classes de enzimas, como a lacases, peroxidases e hemi-celulases, entre outras (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; SU; KA; LAZUR, 2018).

## 2.4 COLEÇÕES BIOLÓGICAS COMO FONTE POTENCIAL DE NOVOS BIOCATALISADORES

A expansão da busca por espécies fúngicas a partir de novas fontes também tem sido um importante aliado para a descoberta de novos metabólitos fúngicos bioativos, já que fungos podem ser encontrados em ambientes inabitáveis pela maioria dos organismos vivos. O sucesso dos processos biotecnológicos está diretamente relacionado com a diversidade dos microrganismos e das moléculas que eles produzem como resultado de seu metabolismo primário e secundário. O aumento da diversidade de compostos químicos para os diferentes setores industriais está, assim, associado com a exploração da diversidade microbiana e são muitos os benefícios esperados como resultado desta exploração (TAKAHASHI et al., 2017)

Além de promover pesquisas que realizem novas coletas de material biológico e que promovam o isolamento de novos microrganismos, é necessário também conhecer e disseminar a informação sobre o que já foi coletado ao longo de muitos anos e encontra-se depositado nas coleções biológicas. Segundo Marinoni e Peixoto (2010), a espinha dorsal do conhecimento em biodiversidade é a pesquisa sistemática nas coleções científicas (MARINONI; PEIXOTO, 2010). Apesar da importância das coleções biológicas ser amplamente reconhecida, Peixoto e cols. comentaram sobre elas:

“No Brasil, a situação das coleções biológicas está muito longe de ser considerada adequada. Muitas delas se encontram em condições precárias em decorrência de infra-estrutura física inadequada e/ou da falta de recursos humanos especializados. Se mantido o quadro atual, será muito difícil para o País atender à demanda de conhecimento e de exploração sustentável do capital natural associado à diversidade de ecossistemas e à riqueza de recursos genéticos.” (PEIXOTO et al., 2006)

Passados vários anos desde o comentário de Peixoto e cols, constata-se que a situação das coleções biológicas, via de regra, pouco mudou. Continua sendo muito necessário valorizar o trabalho de coleta e isolamento já feito por outros pesquisadores e chamar atenção para a importância de preservar o acervo das coleções locais de microrganismos.

### 3 ARTIGO - AVALIAÇÃO DA BIOMASSA DE FUNGOS AMAZÔNICOS COMO FONTE DE LIPASES PARA BIOCATÁLISE (\*)

Israel P. Romano<sup>a\*</sup>, Vanderlei S. dos Santos<sup>b</sup>, Ana Carolina de Lima Paes Louzada<sup>c</sup>, Raimundo C. Pereira Junior<sup>d</sup>, Edson J. do Carmo<sup>e</sup>, Adolfo José da Mota<sup>e</sup>, Hiléia dos S. Barroso<sup>f</sup>, Ivaldo Itabaiana Junior<sup>g</sup>, José Odair Pereira<sup>e</sup>, Spartaco Astolfi Filho<sup>e</sup> e Sandra Patrícia Zanotto<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Pesquisa, Ensino e Pós-graduação – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – Parintins, AM

<sup>b</sup>Central de Análise Química - Centro de Biotecnologia da Amazônia

<sup>c</sup>Escola Superior Batista do Amazonas – Manaus, AM

<sup>d</sup>Universidade do Estado do Amazonas – UEA Campus Tefé

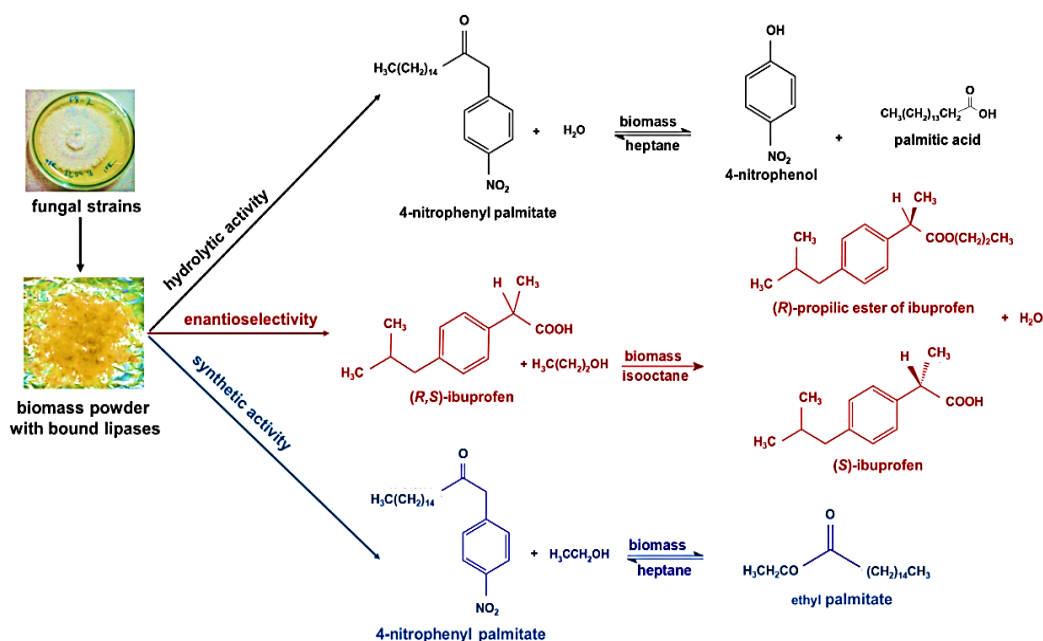
<sup>e</sup>Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Amazonas - UFAM

<sup>f</sup>Departamento de Pesquisa, Ensino e Pós-graduação – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – Manaus, AM

<sup>g</sup>Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, RJ

#### Graphical Abstract

(\*) Revista Química Nova - ISSN 1678-7064 Qualis B2 em Biotecnologia



*Biomass- bound lipases from fungal organisms may exhibit hydrolytic, synthetic and enantioselective activity - useful capabilities for many important applications in biocatalysis*

Publicado *on-line* em 03 de fevereiro de 2020

<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170470>

[*texto entre colchetes contém informação suplementar ao artigo original*]

### 3.1 ABSTRACT : EVALUATION OF AMAZONIAN FUNGI BIOMASS AS A SOURCE OF LIPASES FOR BIOCATALYSIS

We evaluated the biomass of twenty Amazonian fungal isolates as a potential source of mycelium-bound lipases with hydrolytic, synthetic or enantioselective activity for biocatalysis application. We compared the hydrolytic activity of three biomass treatments (delipidated, non-delipidated and cultivated in medium without inducer). Delipidated biomass showed better results in the hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate compared to the other two treatments for fifteen isolates. Delipidated biomass of six *Aspergillus* strains and UEA\_115 strain showed a high synthesis activity of ethyl palmitate by transesterification in organic medium. Results were confirmed by spectrophotometry (410 nm) and gas chromatography. In this reaction, the isolate DPUA\_1539 *A. flavo-furcatis* reached a maximum value of  $668.5 \pm 23.5$  mU.g<sup>-1</sup>. Enantioselective activity assays indicated that biomass-bound lipases from UEA\_115 isolate ( $E = 3.58$ ;  $ee_s = 7 \pm 0$ ) and in particular from the DPUA\_1539 *A. flavo-furcatis* isolate ( $E = 24.15$ ;  $ee_s = 91 \pm 1$ ) have the ability to discriminate enantiomers of the drug ibuprofen by ester synthesis, preferably with (*R*)-enantiomer. These results encourage further investigations of these fungi as potential lipase suppliers for biocatalytic processes such as biodiesel production and enantiopure drugs.

Keywords: lipase; biocatalysis; biomass; enantioselectivity; transesterification; amazonian fungi

## 3.2 INTRODUÇÃO

A biocatálise tem se tornado uma ferramenta cada vez mais importante da biotecnologia. Este campo de pesquisa, em alguns casos, possibilitou reações que não são facilmente conduzidas pela química orgânica clássica e, em outros casos, promoveu reações que podem substituir etapas químicas de alto custo energético e/ou ambiental. Cerca de dois terços da pesquisa em biotransformação envolvem hidrolases, com especial destaque para as lipases.(CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017; GUERRAND, 2017)

Lipases são triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3) cuja capacidade de realizar tanto reações hidrolíticas como de síntese - conforme o meio reacional seja aquoso ou não-aquoso - tem sido extensivamente estudadas e empregadas na indústria já por várias décadas.(DAIHA et al., 2015; KOURIST; HOLLMANN; NGUYEN, 2014; SALIHU; ALAM, 2015) Detergentes, desengordurantes e outros agentes de limpeza são algumas das aplicações consolidadas da atividade hidrolítica destas enzimas. A atividade sintética de lipase, por sua vez, tem aplicações de grande interesse econômico e alto impacto na qualidade de vida, como a produção de cosméticos, de alimentos funcionais enriquecidos com ácidos graxos poli-insaturados e de biodiesel a partir de resíduos oleaginosos.(HAMA; NODA; KONDO, 2018; IMANPARAST; HAMED; FARAMARZI, 2018; KOURIST; HOLLMANN; NGUYEN, 2014) O biodiesel é um combustível líquido composto por monoalquil ésteres e pode ser obtido por transesterificação biocatalisada. Em ambientes aquorrestritos, lipases podem sintetizar monoalquil ésteres a partir da transesterificação de triacilgliceróis, tornando o processo mais atrativo para o uso com matérias-primas de baixo valor agregado.(CIUDAD et al., 2011; HAMA; NODA; KONDO, 2018; ZAGO et al., 2014)

Lipases com atividade enantiosseletiva são de grande interesse para resolução de racematos e obtenção de blocos quirais para síntese química. O mercado para compostos enantiopuros está em crescimento, tornando a obtenção destas moléculas um atrativo campo de pesquisa.(HUDLICKY; REED, 2009; YUAN et al., 2019) Por exemplo, o ibuprofeno – um dos medicamentos mais consumidos no mundo – é uma molécula quiral cuja atividade farmacológica reside majoritariamente no (S)-enantiômero, o qual é 160 vezes mais ativo que o correspondente (R)-enantiômero. Assim, a obtenção do (S)-enantiômero opticamente puro é de grande

relevância.(GHANEM et al., 2010; JOSÉ; TOLEDO; BRIAND, 2015; YUAN et al., 2019)

As numerosas aplicações industriais das lipases têm estimulado o interesse no isolamento de novas lipases a partir de novas fontes. O desenvolvimento de metodologias e estratégias para seleção de lipases com atividade sintética e enantiosseletiva continua sendo um tópico relevante.(PÖHNLEIN et al., 2015; ZHANG et al., 2012; ZHENG et al., 2014) Rapidez, confiabilidade e baixo custo são as principais características almejadas, mas é difícil combina-las numa única metodologia.

As lipases microbianas têm sido mais amplamente empregadas em processos industriais do que as derivadas de plantas e animais devido à sua maior termoestabilidade, tolerância a variações de pH e estabilidade em solventes orgânicos. Além disso, elas têm maiores rendimentos de produção, facilidade de manipulação genética e crescimento rápido em meios de baixo custo. Entre as fontes microbianas, os fungos filamentosos se destacam como fornecedores de lipases para uma ampla - e sempre crescente - gama de aplicações.(GEOFFRY; ACHUR, 2018; MEHTA; BODH; GUPTA, 2017)

A imobilização enzimática possibilita a manutenção da atividade catalítica por mais tempo, além de facilitar a recuperação e reutilização do biocatalisador. Inúmeras estratégias têm sido propostas para a imobilização de enzimas extracelulares. Por outro lado, a biomassa fúngica, também chamada micélio, possui toda uma maquinaria enzimática própria. As enzimas ligadas ao micélio podem ser consideradas enzimas naturalmente imobilizadas, e têm uma óbvia atração de custo em comparação com o uso de enzimas livres ou solúveis em biotransformações. Assim, a biomassa fúngica pode ser usada como uma fonte direta da enzima, eliminando a necessidade de isolamento, procedimentos de extração, purificação e imobilização externa.(CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017; LOO et al., 2014; ZANOTTO et al., 2009)

Espécies da biodiversidade de fungos da Amazônia, potencial fonte de enzimas para diversos campos da biotecnologia, ainda são pouco conhecidas, embora os estudos acerca da biocatálise tenham avançado mundialmente. Trabalhos de *screening* da biodiversidade em busca de novos biocatalisadores contribuem para o conhecimento e valorização dos recursos naturais amazônicos, fortalecendo as iniciativas para a conservação destes recursos.(ZANOTTO et al., 2009)

Neste estudo, foi investigado o potencial da biomassa de seis linhagens de *Aspergillus* e de quatorze linhagens fúngicas não-identificadas, todas coletadas na região amazônica, como fonte de lipases ligada ao micélio para aplicações em biocatálise, tanto em meio aquoso (atividade hidrolítica) como em meio orgânico (atividade sintética e enantiosseletiva). Comparou-se o efeito de três tratamentos da biomassa sobre a atividade hidrolítica. A atividade sintética foi avaliada por um ensaio de transesterificação e quantificada por duas metodologias diferentes. A capacidade enantiosseletiva das lipases foi avaliada por meio da resolução do fármaco (*R,S*)-ibuprofeno.

### 3.3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.3.1 Reagentes

Foram utilizados neste estudo maltose da marca Vetec e peptona da marca Difco. Fosfato de potássio bibásico, fosfato de sódio bibásico e sulfato de magnésio, todos de grau PA, foram comprados da fornecedora Nuclear. O óleo de oliva comercial extravirgem marca Gallo foi adquirido no comércio local. Os solventes de grau PA hexano, clorofórmio, éter, ácido acético glacial, acetona e álcool butílico foram adquiridos da empresa CRQ. Triton-X PA foi comprado da Neon e a goma arábica da empresa Synth. Os padrões de alta pureza grau CG (> 98 %) palmitato de *p*-nitrofenila, *p*-nitrofenol, (*R,S*)-ibuprofeno, (*S*)-ibuprofeno, palmitato de etila e palmitato de metila, bem como os solventes grau HPLC heptano, hexano, isooctano e etanol, além do derivatizador N-metil-silil-trifluoracetamida (MSTFA) e da peneira molecular de 4 Angström foram comprados da Sigma-Aldrich. Os solventes grau HPLC 1-propanol, 2-propanol, bem como o ácido cítrico monoidratado PA foram adquiridos da J. Baker. Ácido acético grau HPLC foi comprado da Merck. O fármaco ibuprofeno racêmico marca MOTRIN 600 mg (Pfizer) foi comprado numa farmácia local.

#### 3.3.2 Microrganismos e condições de cultivo

##### 3.3.2.1 Procedência dos isolados

Seis linhagens certificadas de cinco espécies do gênero *Aspergillus* foram gentilmente cedidas pela Coleção do Departamento de Parasitologia da Universidade

Federal do Amazonas (DPUA-UFAM), na forma de culturas esporuladas: *A. niger* DPUA\_398, *A. niger* DPUA\_399, *A. japonicus* DPUA\_613, *A. foetidus* DPUA\_1245, *A. awamorii* DPUA\_1473 e *A. flavo-furcatis* DPUA\_1539 [Imagem 1, pg. 78]. Quatorze linhagens não identificadas foram gentilmente cedidas por colegas pesquisadores do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas (MBT-UEA) na forma de micélios vegetativos conservados em água destilada estéril [Imagem 2, pg. 78]. Estas linhagens foram isoladas a partir dos corpos de frutificação de macrofungos coletados nos fragmentos florestais de instituições de pesquisa da região, e incluídas no presente trabalho por terem apresentado atividade de lipase em testes preliminares com os substratos tributirina ou óleo de oliva. São referenciados neste artigo pelo prefixo “UEA\_” seguido de um código individual. Uma linhagem que apresentou significativa atividade sintética e enantiosseletiva foi identificada em nível de espécie através de técnicas moleculares.(ZHANG et al., 2000) [ver a Tabela 2 do Apêndice I, pg. 78, para informações atualizadas sobre a identificação das linhagens].

### 3.3.2.2 Fermentação submersa

Todas as vinte linhagens foram cultivadas em meio líquido preparado segundo Sun et al.,(SUN; XU, 2009) (% p/v): maltose 0,5; peptona 4,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3; MgSO<sub>4</sub> 0,05; óleo de oliva comercial 2.4. O pH foi ajustado para 5,5. A fermentação submersa foi conduzida em frascos de erlenmeyer de 250 mL contendo 20 mL do meio. No cultivo das linhagens das espécies de *Aspergillus*, os frascos foram inoculados com um volume de suspensão de esporos para obter a concentração de  $1 \times 10^6$  esporos/L [a suspensão de esporos foi preparada a partir da reativação das linhagens matrizes em placas de petri com meio BDA, 28 °C, por 3 a 6 dias – ver pg. 79, Imagem 3b] . A quantidade de esporos nas suspensões foi determinada por contagem em câmara de Neubauer [Imagem 4, pg.80]. Os frascos inoculados foram incubados em agitador orbital a 200 rpm, 30 °C, por 5 dias. Para as demais linhagens não esporuladas, utilizou-se como inóculo três discos de micélio de aproximadamente 10 mm de diâmetro em cada frasco [os inóculos foram obtidos a partir da reativação das linhagens matrizes em placas com meio BDA, 28 °C, por 5 a 10 dias – ver pg. 79, Imagem 3a]. Visto que testes preliminares indicaram que a massa micelial das

linhagens não esporuladas crescia melhor em cultivo estático, elas foram incubadas em BOD sem agitação à 28°C por 7 dias.

### 3.3.2.3 Fermentação em meio sem indutor

Com o propósito de confirmar a eficiência do óleo de oliva comercial como indutor da produção lipase, bem como verificar a presença de lipases constitutivas na biomassa, todos os isolados foram submetidos também à fermentação submersa em meio Sun sem adição do óleo de oliva, nas mesmas condições descritas acima.

### 3.3.3 *Preparação do micélio para uso como biocatalisador*

#### 3.3.3.1 Coleta e dessecação

Após o período de incubação, o micélio crescido nos frascos foi coletado do meio de cultivo por filtração simples sobre gazes esterilizadas, realizada em capela de fluxo laminar. O caldo de cultivo foi armazenado sob refrigeração para uso posterior. Em seguida à filtração simples, a biomassa micelial de cada isolado foi lavada e filtrada à vácuo com 100 mL de água destilada estéril e 100 mL de acetona, respectivamente. O micélio lavado e filtrado foi dessecado sob vácuo até peso constante (TORRES et al., 2003) - em média por 96h [*Imagens 5d, 5e, 5f, pg. 80*].

#### 3.3.3.2 Delipidação, trituração e peneiramento

A remoção dos lipídios [*delipidação*] impregnados nos micélios que cresceram em meio com óleo de oliva foi realizada utilizando-se 10 mL de uma solução clorofórmio: butanol (9:1). O sistema contendo micélio e solução de clorofórmio:butanol foi colocado sob agitação (200 rpm, 40 °C, 15 min). Em seguida, o micélio foi coletado e novamente lavado sob agitação com mais 10 mL da mesma solução. Retirou-se uma fração da solução utilizada na segunda lavagem e verificou-se a remoção dos lipídios por cromatografia de camada delgada, pela comparação com soluções do óleo de oliva comercial e de ácido oleico PA. O eluente utilizado foi



hexano: éter: ácido acético (7:3:0,1), empregando-se iodo como revelador [*Imagem 6, pg. 81*]. Quando necessário, o procedimento foi repetido.(FERNANDES et al., 2007) O micélio delipidado foi dessecado sob vácuo por 24 h e depois triturado a pó e peneirado com uma peneira simples de cozinha, resultando numa preparação bruta de lipases ligadas ao micélio para utilização como biocatalisador nas reações [*Imagem 7, pg. 81*].

### 3.3.3.3 Biomassa não-delipidada e biomassa cultivada sem indutor

Visando avaliar o efeito da delipidação sobre a atividade hidrolítica das lipases, uma fração da biomassa de todas as linhagens cultivadas em meio com óleo de oliva foi dessecada, triturada e peneirada sem ser submetida ao processo de delipidação. A biomassa obtida a partir do crescimento das linhagens em meio sem óleo de oliva foi tratada do mesmo modo que a biomassa não-delipidada.

### 3.3.4 Avaliação da atividade hidrolítica

#### 3.3.4.1 Ensaio enzimático

O ensaio de hidrólise do pNPP (palmitato de *p*-nitrofenila), que libera *p*-nitrofenol (pNP) detectado por espectrofotometria, foi usado para avaliar a atividade hidrolítica das lipases ligadas ao micélio [*Imagem 8a, pg. 82*]. Dez mL de pNPP em isopropanol (3,2 mg/mL) foram emulsificados com 90 mL de uma solução aquosa de goma arábica 0,1 % e Triton-X-100 0,4 %. No ensaio enzimático foram utilizados 900 µL do substrato emulsificado e 05 miligramas de micélio delipidado e triturado suspensos em 100 µL de tampão citrato-fosfato (0,5 M; pH 5), resultando numa concentração final de 0.85 mM de pNPP. A reação foi realizada em microtubos de 2 mL incubados em agitador orbital (40 ° C, 150 rpm), por dois minutos. Imediatamente após este tempo, o sistema reacional foi centrifugado (14.000 g, 2 min) e coletou-se o sobrenadante.(GEOFFRY; ACHUR, 2017).

O pNP liberado foi detectado a 410 nm e quantificado a partir de uma curva padrão ( $R^2 = 0,9988$ ) [*Imagem 11, pg. 85*] feita com concentrações conhecidas deste composto. Os brancos foram obtidos pela leitura do sistema reacional sem micélio. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que

liberou 1 micromol de pNP por minuto, nas condições deste ensaio. A atividade específica foi expressa em miliunidades por grama de biomassa seca ( $\text{mU}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Foram também realizados ensaios utilizando a biomassa não-delipidada e a biomassa cultivada em meio sem indutor de todos os isolados fúngicos, nas mesmas condições descritas acima.

#### 3.3.4.2 Testes estatísticos

O teste ANOVA de um fator, com nível de significância de 5% e pós-teste de agrupamento de Tukey, assumindo-se a igualdade das variâncias, foi aplicado para verificar a igualdade das médias da atividade hidrolítica. Inicialmente, o teste foi aplicado para cada isolado fúngico em separado, a fim de avaliar a significância estatística da diferença dos resultados obtidos com os três tratamentos aplicados ao micélio (delipidado, não-delipidado e crescido em meio sem indutor). A seguir, as médias de todos os isolados fúngicos obtidas com micélio delipidado foram testadas. Os resultados são apresentados como a média de três réplicas e seu desvio-padrão. O software estatístico empregado foi o Minitab 18 para Windows .

#### 3.3.5 Avaliação da atividade sintética

##### 3.3.5.1 Ensaio enzimático de transesterificação em meio orgânico

Foi utilizado o ensaio de transesterificação entre pNPP e etanol, produzindo pNP e palmitato de etila (PEt)(TENG; XU, 2007)[*Imagem 8b, pg. 82*]. Em microtubos de 2 mL contendo 50 mg de micélio triturado foram aliquoteados 1 ml de uma solução 10 mM de pNPP em n-heptano. A reação foi iniciada com a adição de 60  $\mu\text{L}$  de etanol 1 M. Os microtubos foram incubados em agitador orbital termostaticado, a 40° C, 200 rpm, durante 30 min. Devido a maior quantidade de micélio necessária para a sua realização, os ensaios foram conduzidos em duplicata.

Após os 30 minutos de reação, o conteúdo de cada microtubo foi coletado com uma seringa de vidro e filtrado (PTFE hidrofóbico, 13 mm de diâmetro, poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ), para remoção do micélio e interrupção da biocatálise. O sistema reacional filtrado foi utilizado na determinação da atividade sintética de lipase por duas metodologias diferentes, descritas a seguir.

### 3.3.5.2 Determinação por espectrofotometria da atividade sintética pela detecção do pNP liberado

Imediatamente após a filtração, 25 µL do filtrado foram coletados e misturados com 1 mL de uma solução de NaOH 0,1 M, possibilitando que o pNP eventualmente liberado na reação fosse extraído da fase orgânica para a fase aquosa alcalina. A seguir, 200 µL de cada fase aquosa alcalina foram transferidos para os poços de uma microplaca de titulação (96 poços). O pNP foi detectado a 410 nm utilizando um espectrofotômetro de UV-visível com leitor de microplacas (modo PathCheck) da SpectraMax 384 Molecular Devices. Os brancos foram obtidos pela leitura do sistema reacional sem micélio. A liberação de pNP foi calculada a partir de uma curva padrão ( $R^2= 0,9948$ ) [Imagem 12, pg. 85] feita com concentrações conhecidas deste composto. [O pNP foi solubilizado em heptano sob agitação (200 rpm, 40 °C, 48 h) ]

### 3.3.5.3 Determinação da atividade sintética pela detecção da formação de PEt por CG-DIC

Quarenta microlitros do meio reacional filtrado foram misturados com 20 µL de N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) em vials de vidro de 2mL, para derivatização dos ácidos graxos residuais. Após 15 minutos, adicionou-se 900 µL de heptano e 40 µL do padrão interno palmitato de metila (PMEt) ( $40 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), para completar o volume de 1 mL.

As análises cromatográficas foram realizadas no CG-DIC modelo QP2010, fabricante Shimadzu, equipado com auto-injetor modelo AOC 20i, do mesmo fabricante. O equipamento foi programado para injetar 1µL de cada amostra. O CG-DIC foi configurado inicialmente para injeção em modo split a 10 e temperatura do injetor a 250°C. Foi utilizado hélio como gás de arraste. O fluxo total foi ajustado 14,0 mL/min, e o fluxo da coluna 1.00 mL/min. A coluna capilar utilizada foi de sílica fundida, modelo Restek RTX-5 de 28 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de filme interno de difenil dimetil polisiloxano (Agilent). A rampa de aquecimento da coluna iniciou em 180 °C, por 3 minutos. Depois a temperatura foi elevada a taxa de 6 °C/min até 280 °C, finalizando o tempo de corrida em 19,67 minutos. O detector DIC foi configurado a temperatura de 300°C com make-up de gás hélio em fluxo de 30,0

mL/min, o fluxo de gás de hidrogênio a 40 mL/min , fluxo de ar sintético a 400 mL/min e tempo de detecção de 25min.

A identificação dos picos cromatográficos foi feita pela comparação com os tempos de retenção dos picos de padrões de alta pureza, injetados nas mesmas condições. A quantidade PEt sintetizada foi calculada com base nas áreas do picos cromatográficos, utilizando-se uma curva padrão ( $R^2= 0,9995$ ) [*Imagem 13, pg. 86*], obtida pela aplicação da fórmula:

$$FR = \frac{A.P.I}{A.P.A} \quad (1)$$

onde FR= fator de resposta; A.P.I. = área do pico padrão interno e A.P.A = área do pico do padrão analítico, para concentrações conhecidas do padrão interno e do analito

### 3.3.6 Avaliação da atividade enantiosseletiva

A capacidade das lipases ligadas ao micélio apresentarem enantiopreferência foi avaliada no ensaio de esterificação do ibuprofeno racêmico presente no fármaco Motrin. O solvente isooctano foi previamente seco com peneira molecular 0,2 % (p/v). Na preparação deste ensaio os comprimidos do fármaco foram triturados e pesados para corresponder à concentração desejada, e adicionados ao solvente. A mistura foi solubilizada em agitador orbital (200 rpm, 40 °C) por 30 minutos. O excipiente insolúvel foi removido por filtração à vacuo com membrana filtrante (poro de 0,45 µm). Um mL da solução filtrada foi lido a 254 nm numa cubeta de quartzo e a concentração do analito foi determinada com o auxílio de uma curva de calibração ( $R^2= 0,9987$ ) [*Imagem 14, pg. 86*] feita a partir de concentrações conhecidas de um padrão de alta pureza. Quando necessario, adicionou-se isooctano seco ou (*R,S*) ibuprofeno puro. O meio reacional padrão foi composto por 10 mL de solução de ibuprofeno racêmico (60mM) e 1-propanol (150 mM) em isooctano. A reação foi iniciada pela adição de 0,3 g de micélio triturado e realizada em erlenmeyers de 100 mL selados com papel alumínio e filme de pvc. O sistema reacional foi colocado sob agitação (200 rpm, 40 °C). Experimentos sem adição de micélio foram realizados para avaliação da porcentagem de esterificação espontânea do sistema. Aliquotas de 100

$\mu\text{L}$  foram coletadas em diferentes tempos e diluídas em 1,4 mL de isooctano seco para análise por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna quiral.(CARVALHO et al., 2006) Os ensaios foram realizado em duplicata.

O equipamento empregado na análise foi o UFLC Shimadzu modelo LC-20AD, acomplado com detector UV-Vis modelo SPD- M20A e auto injetor SIL-20 AHT. A coluna quiral foi a Astec Celulose DMP 5UM (25 cm x 4,6 mm). A fase móvel usada foi hexano/isopropanol/ácido acético na proporção de 98/2/0,5 v/v com fluxo de 0,4 mL/min em condição isocrática [*Esta formulação da fase móvel foi adaptada de Siodmiak, Ruminski e Marszall (2012)*]. O comprimento de onda monitorado foi de 254 nm. O tempo total de corrida para cada amostra foi de 25 min. A identificação dos picos correspondentes aos enantiômeros (*R*) e (*S*) do ibuprofeno foi realizada por comparação do tempo de retenção da amostra com os de padrões de alta pureza injetados nas mesmas condições. A quantidade de cada enantiômero foi calculada a partir de uma curva padrão ( $R^2 = 0,9997$  para ambos) [*Imagem 15, pg. 87*] das áreas dos picos detectados em concentrações conhecidas. A capacidade enantiosseletiva das lipases foi determinada levando-se em conta o valor de conversão (*c*) conforme cálculos propostos nas literatura.(CHEN et al., 1982; FABER; KROUTIL, 2012)

$$c = 1 - \frac{S + R}{S_0 + R_0} \quad (2)$$

onde *S* = concentração final do enantiômero (*S*); *R* = concentração final do enantiômero (*R*); *S*<sub>0</sub> = concentração inicial do enantiômero *S*; *R*<sub>0</sub> = concentração inicial do enantiômero *R*.

Os valores de excesso enantiomérico do substrato (*ee<sub>s</sub>*) e razão enantiomérica (*E*) segundo os calculos propostos por Faber:(FABER, 2018)

$$ee_s = \frac{S - R}{S + R} \quad (3)$$

onde *S* = concentração final do enantiômero (*S*) e *R* = concentração final do enantiômero (*R*).

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ee_s)]}{\ln [(1 - c)(1 + ee_s)]} \quad (4)$$

onde  $c$  = conversão e  $ees$  = excesso enantiomérico do substrato.

### 3.3.7 Identificação molecular

A extração do DNA total foi realizada a partir de 1 mg de micélio fresco com o kit Plant/Fungi DNA Isolation (Norgen Biotek Corp). A região do DNA ribossômico de interesse foi amplificada por PCR com os primers ITS1 e UniR.(FELL, 1993) A PCR foi realizada com o kit GoTaq Flexi (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. O produto da PCR foi purificado com o kit Purelink PCR purification (Invitrogen by Thermo) e quantificado em um fluorímetro Qubit 2.0 com o kit dsDNA (Invitrogen by Thermo). Dez nanogramas dos amplicons puros alimentaram a reação de sequenciamento com o kit BigDye Terminator, v.3.1, usando os primers já citados. As sequências foram determinadas em um analisador genético ABI3500 (Applied Biosystems by Thermo), editadas no programa SeqMan Pro e comparadas com a base de dados do GenBank usando a ferramenta BlastN.(ALTSCHUL et al., 1990)

## 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.4.1 Avaliação da atividade hidrolítica

A Figura 1 mostra os resultados das atividades hidrolíticas avaliadas por testes ANOVA para igualdade e de Tukey para agrupamento das médias dos três tratamentos da biomassa.

#### 3.4.1.1 Comparação dos tratamentos

Em todos os vinte isolados fúngicos testados, a média de pelo menos um dos três tratamentos foi avaliada como estatisticamente diferente. Para quinze

isolados, a biomassa delipidada foi o tratamento que obteve as médias mais altas de atividade enzimática, e onze destas médias mais altas foram avaliadas como tendo significância estatística. Estes dados confirmam a estabilidade das lipases ligadas ao micélio como enzimas naturalmente imobilizadas, capazes de suportar um tratamento agressivo (a lavagem com solução clorofórmio:butanol) sem perda da atividade. De fato, a delipidação da biomassa, via de regra, teve o efeito de aumentar a atividade hidrolítica. Uma possível explicação para este efeito seria o aumento da superfície de contato das lipases com o substrato, propiciada pela remoção dos lipídios impregnados.

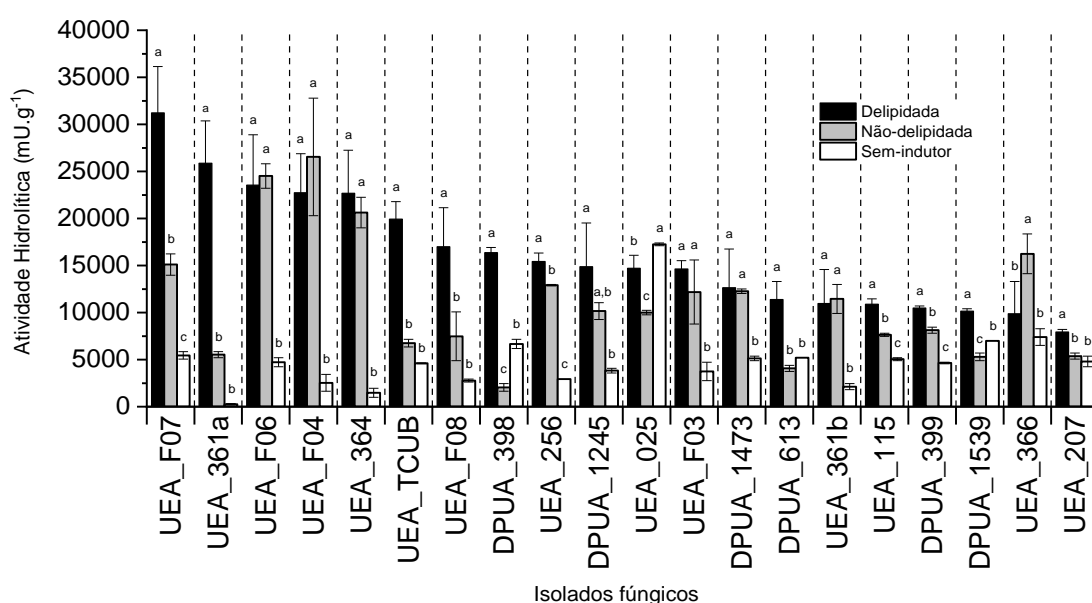


Figura 1 - Testes ANOVA de igualdade entre as médias e pós-teste de Tukey da atividade hidrolítica das biomassas delipidada, não-delipidada e crescida em meio sem indutor, de vinte isolados fúngicos. Os testes foram aplicados para as médias dos tratamentos da biomassa de cada isolado fúngico separadamente. Letras iguais entre as médias dos tratamentos de um mesmo isolado representam valores iguais para um nível de significância de 5 %. Letras iguais entre médias dos tratamentos de isolados diferentes não implicam em valores estatisticamente iguais

Para quatro linhagens fúngicas, o tratamento que obteve as maiores médias foi a biomassa não-delipidada. Verifica-se desse modo que dezenove dos vinte isolados apresentaram maior atividade hidrolítica com a biomassa cultivada em presença do óleo de oliva. Estes resultados estão de acordo com a literatura a respeito

da eficiência do óleo de oliva como indutor da produção de lipase em microrganismos - e justificam o uso do azeite comercial como substituto de baixo custo ao óleo de alta pureza.

Por outro lado, todas as linhagens apresentaram alguma atividade hidrolítica na biomassa crescida em meio sem indutor, mesmo que em quantidade comparativamente baixa, como no caso do isolado UEA\_361a (aproximadamente 260 mU.g<sup>-1</sup>). Esses resultados indicam a presença de lipase constitutiva em todos os micélios. O isolado UEA\_025 foi o que exibiu a mais alta atividade de lipase constitutiva (17.250 mU.g<sup>-1</sup>), sendo esse o único fungo no qual o tratamento sem indutor exibiu maior atividade do que os outros dois tratamentos, e com diferença estatisticamente significativa.

### 3.4.1.2 Comparação dos resultados obtidos com a biomassa delipidada

Visto que a maioria dos isolados apresentou os melhores resultados com a biomassa delipidada, a média obtida com este tratamento foi escolhida para comparação dos isolados entre si. A Figura 2 mostra os resultados dos testes ANOVA para a igualdade e de Tukey para o agrupamento destas médias.

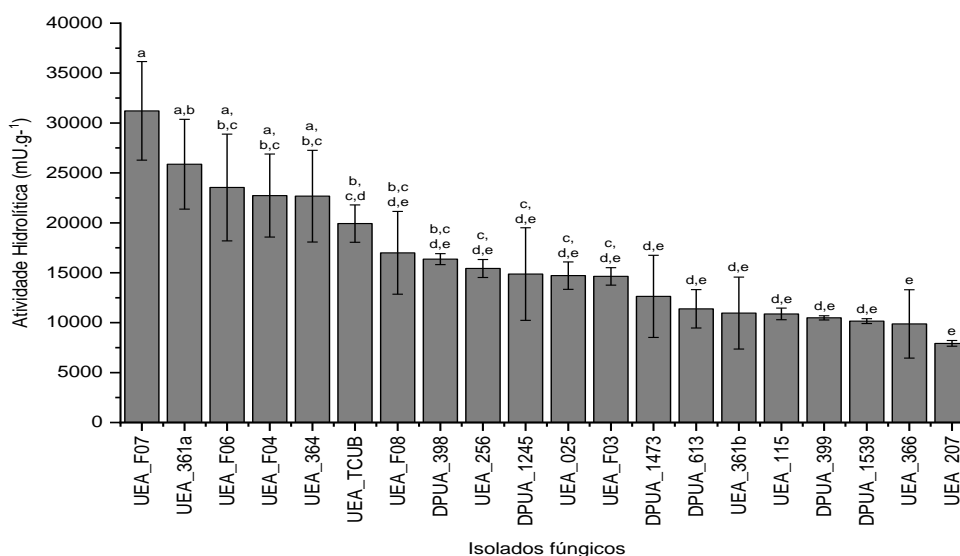


Figura 2 - Testes de igualdade entre as médias da atividade hidrolítica da biomassas delipidada de vinte isolado fúngicos. Letras iguais entre as médias representam valores iguais para um nível de significância de 5 %



Os isolados fúngicos prefixo UEA\_ F07, 361, F06, F04 E 364 obtiveram, respectivamente, as médias mais altas de atividade hidrolítica, variando de  $31.214 \pm 4.935$  a  $22.671 \pm 4.589$  mU.g<sup>-1</sup>. Entretanto, a diferença entre as médias destes isolados não foi avaliada como estatisticamente significativa. Por outro lado, a menor atividade hidrolítica dentre os vinte isolados foi também de uma linhagem da UEA, a 207, que alcançou  $7.927 \pm 290$  mU.g<sup>-1</sup>.

Dentre os fungos do genero *Aspergillus* testados, a maior média foi obtida com a linhagem DPUA\_398 *A. niger* ( $16.366 \pm 550,76$  mU.g<sup>-1</sup>) e a menor, com a linhagem DPUA\_1539 *A. flavo-furcartis* ( $10.155 \pm 245$  mU.g<sup>-1</sup>).

Na literatura, entre os estudos que avaliaram a atividade de lipase ligada ao micélio pelo ensaio de hidrólise de pNPP, existem significativas variações no procedimento de ensaio – por exemplo, nas proporções entre pNPP e emulsificante e na composição do tampão utilizado. Há variações também nas formulações dos meios de cultivo da biomassa, bem como nos tratamentos aos quais a biomassa foi submetida (lavagem, filtração, dessecagem, liofilização, delipidação etc). Essas diferenças na metodologia sem dúvida relativizam qualquer comparação dos valores de atividade hidrolítica entre os trabalhos publicados. Ainda assim, tal comparação pode fornecer indícios sobre quais linhagens de microrganismos - e quais condições de cultivo/tratamento da biomassa - são provavelmente mais promissoras na triagem de lipases com elevada capacidade de hidrólise.

Um cotejo dos resultados apresentados nesta seção com os de outros estudos que também avaliaram lipases ligadas ao micélio pela hidrólise de pNPP mostrou que, na maioria dos casos, a atividade hidrolítica das linhagens amazônicas testadas neste trabalho foi mais alta. Regner *et al.*, (REGNER *et al.*, 2019) trabalhando com *A. niger* (linhagem MYA 135) e testando diversas formulações de meio preparadas a partir de matérias primas e resíduos agro-industriais, obtiveram aproximadamente 850 mU.g<sup>-1</sup> usando micélio lavado com água e acetona e centrifugado. Anteriormente, Colin *et al.*, (COLIN; BAIGORÍ; PERA, 2011) trabalhando com a mesma linhagem de *A. niger*, mas cultivada em meio suplementado com óleo de oliva e Fe<sup>+3</sup>, relataram atividade hidrolítica de aproximadamente 1.800 mU.g<sup>-1</sup> utilizando micélio úmido (lavado e centrifugado). Sun *et al.* (SUN; XU; WANG, 2009) purificaram a lipase ligada ao micélio de *Rizhopus chinensis*. No início de seu trabalho,

eles mensuraram a atividade de lipase na biomassa bruta em  $4.8 \text{ U.g}^{-1}$  (equivalente a  $4.800 \text{ mU.g}^{-1}$ ).

Dentre os trabalhos que localizamos, apenas dois relataram atividades maiores dos que as obtidas em nosso estudo. De Castro *et al.*, trabalhando com o micélio liofilizado de *A. westerdijkiae*, relataram o excepcional valor  $40.000 \text{ U.g}^{-1}$  (equivalente a  $40.000.000 \text{ mU.g}^{-1}$ ). (DE CASTRO *et al.*, 2017) Yadav *et al.*, utilizando micélio ressuspendido em tampão de *Yarrowia lipolytica* (linhagem NCIM 3639), obtiveram a  $101 \text{ U.g}^{-1}$  (o equivalente  $101.000 \text{ mU.g}^{-1}$ ) de atividade. (YADAV *et al.*, 2011)

### 3.4.2 Avaliação da atividade sintética

Os tempos médios de retenção para o palmitato de metila (padrão interno), palmitato de etila (produto da transesterificação) e palmitato de *p*-nitrofenila (reagente limitante) foram, na ordem: 7.98, 8.94 e 15.22 minutos (Figura 3).

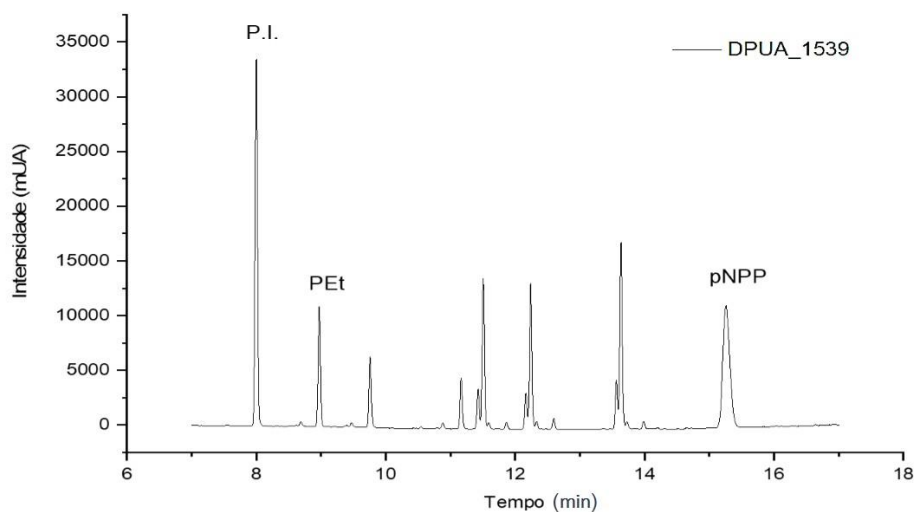


Figura 3 - Cromatograma da transesterificação biocatalisada pelo isolado DPUA\_1539, indicando os picos correspondentes ao padrão interno palmitato de metila (PI), ao produto (PEt) e ao reagente limitante (pNPP)

A Figura 4 exibe os percentuais da atividade sintética relativa de cada isolado fúngico, calculados a partir da atividade específica determinada por CG-DIC (detecção do PEt) e por espectrofotometria (detecção do pNP por absorvância a 410 nm).

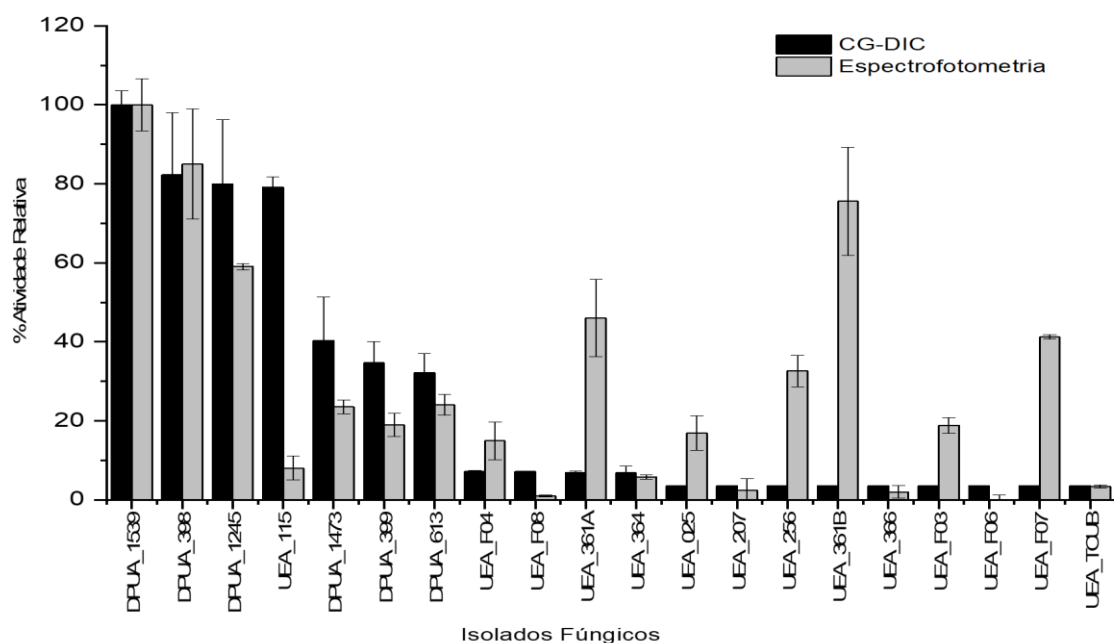


Figura 4 - Atividade sintética relativa do isolados fúngicos, calculada a partir da atividade específica determinada por CG-DIC e por espectrofotometria

O isolado DPUA\_1539 *A. flavo-furcatis* apresentou os valores absolutos mais altos de atividade específica na formação de ambos os produtos, a saber,  $668,5 \pm 23,5$  mU.g<sup>-1</sup> para a formação PEt e  $600,5 \pm 39,4$  mU.g<sup>-1</sup> para o pNP. Os percentuais de conversão foram respectivamente 10% e 9%. Por essa razão, este isolado foi escolhido para ser o padrão de referência, equivalente a 100 % de atividade relativa em ambas as metodologias.

Verificou-se que, para 14 isolados, a diferença entre as atividades relativas foi inferior a 21 %. Entre estes isolados, os cinco com menores percentuais calculados segundo a espectrofotometria (menos que 5%) também apresentaram baixos percentuais de acordo com cromatografia gasosa (menos que 10%). Estes resultados indicam uma razoável concordância entre as duas metodologias de determinação da atividade enzimática. Uma exceção notável foi o isolado UEA\_115, com apenas 8% de atividade de acordo com a espectrofotometria, mas 79,2 % de

atividade segundo a cromatografia gasosa. Por outro lado, os isolados UEA\_361a, UEA\_361b, UEA\_256 e UEA\_F07 apresentaram percentuais expressivos segundo a espectrofotometria (acima de 30 %) e percentuais muito baixos de acordo com a cromatografia gasosa (menos de 4%).

A transesterificação é a reação central na produção de biodiesel – um dos tópicos de maior relevância para a biocatálise nestas primeiras décadas do século XXI. Ensaio de transesterificação biocatalisada de triacilgliceróis para a obtenção de biodiesel tipicamente duram muitas horas ou mesmo dias. Assim, na prospecção de novas enzimas microbianas para utilização na produção de biodiesel, um ensaio de baixo custo que permita verificar de forma rápida e precisa a capacidade de transesterificação é de grande utilidade. O ensaio de transesterificação do pNPP com etanol, proposto por Teng e Xu, (TENG; XU, 2007) tem como pontos altos o baixo custo e a rapidez na verificação do resultado. Entretanto, a comparação dos resultados obtidos em nosso trabalho, levando em conta a maior sensibilidade e robustez da quantificação de produtos via CG-DIC, sugere que o ensaio espectrofotométrico de Teng e Xu é suscetível a resultados falsos positivos. A literatura indica que *p*-nitrofenol ésteres podem eventualmente sofrer hidrólise não-enzimática. (STOYTCHIEVA et al., 2012) No caso de enzimas não-purificadas, é preciso levar em conta a possibilidade de que compostos provenientes do meio de cultivo ou da matriz celular possam interferir na leitura da absorbância. Mesmo o processo de delipidação empregado neste trabalho pode não remover por completo estes interferentes. Ainda assim, a relativa concordância entre as metodologias sugere que o ensaio espectrofotométrico pode ser empregado como triagem preliminar, qualitativa, visando eliminar da seleção as linhagens menos promissoras.

Os resultados mostrados na Figura 4 também permitem verificar que as linhagens de *Aspergillus* tiveram seis dos sete resultados mais altos de atividade sintética avaliada pela formação de PEt. De fato, diversos estudos relacionados a síntese de ésteres e ao biodiesel empregaram lipases ligadas ao micélio deste gênero de fungo. (COLIN; BAIGORÍ; PERA, 2011; DE CASTRO et al., 2017; REGNER et al., 2019; REINEHR; TREICHEL, 2016; ROMERO et al., 2013) Romero *et al.* (ROMERO et al., 2013) e Colin *et al.* (COLIN; BAIGORÍ; PERA, 2011) avaliaram a atividade sintética das lipases ligadas ao micélio de *A. niger* MYA 135 pela transesterificação entre pNPP e etanol, mensurada pela liberação do pNP detectada a 405 nm. Usando micélio lavado superficialmente com acetona e centrifugado, Romero *et al.* obtiveram

como melhor resultado  $69,4 \pm 9,4 \text{ mU.g}^{-1}$ . Empregando micélio que fora apenas centrifugado, Colin *et al.* relataram com melhor atividade o valor de  $59,3 \pm 3,8 \text{ mU.g}^{-1}$ . Como comparação, em nosso estudo a atividade sintética da biomassa delipidada de *A. niger* DPUA\_398 determinada pelo método espectrofotométrico foi expressivamente superior, sendo de  $510,1 \pm 83,6 \text{ mU.g}^{-1}$ . A cromatografia gasosa apresentou um valor de atividade semelhante para este isolado ( $549,7 \pm 105,8 \text{ mU.g}^{-1}$ ).

### 3.4.3 Avaliação da enantiosseletividade

Os isolados DPUA\_1245, UEA\_364 e UEA\_366 não foram testados nesta etapa por não terem produzido massa micelial suficiente para utilização na reações. Assim, verificou-se a atividade enantiosseletiva de lipases de dezessete isolados fúngicos através da resolução do ibuprofeno racêmico pela esterificação com 1-propanol em isooctano. Dois destes isolados apresentaram atividade enantiosseletiva. A Tabela 1 apresenta os melhores resultados obtidos com estes fungos.

Tabela 1 - Enantiosseletividade na esterificação do (R,S)-ibuprofeno

Isolado fúngico*	<i>E</i>	% c	% ee <sub>s</sub>	Tempo de reação (h)
DPUA_1539 ( <i>A. flavo-furcatis</i> )	24,15	54 ± 3	91 ± 1	96
UEA_115	3,58	11 ± 3	7 ± 0	144

\*As lipases de ambos os isolados demonstraram enantiopreferência pelo (R)-ibuprofeno

A resolução cinética enzimática utilizando lipases envolve discriminar entre os enantiômeros e melhorar a taxa de hidrólise ou esterificação de um deles. (JOSÉ; TOLEDO; BRIAND, 2015) O parâmetro adimensional *E*, denominado *razão enantiomérica*, descreve a dependência da conversão (c) e do excesso enantiomérico do substrato (ee<sub>s</sub>), permitindo avaliar a seletividade da resolução do racemato. Embora a qualidade de uma resolução cinética seja caracterizada pelo excesso enantiomérico, um elevado valor da razão enantiomérica é essencial para o sucesso da resolução. Um valor de *E* alto assegura não apenas um excesso enantiomérico elevado, mas também um rendimento proporcionalmente alto. Um valor de *E* abaixo de 10 para qualquer biotransformação evidencia inviabilidade prática como processo

enantiosseletivo. Por outro lado, valores de  $E$  entre 10 e 30 indicam um processo promissor e, acima de 30, um processo excelente (COSTA; DE AMORIM, 1999; FABER; KROUTIL, 2012).

Na literatura, a hidrólise enantiosseletiva de ( $R,S$ )-ésteres de ibuprofeno por lipases tem sido empregada em vários trabalhos como rota enzimática para a obtenção do  $S$  enantiômero. Alguns destes trabalhos relatam elevados valores de  $E$ .(GANDOMKAR et al., 2015; GONAWAN et al., 2013; HABIBI; MOHAMMADI; YOUSEFI, 2013; YOUSEFI; MOHAMMADI; HABIBI, 2014) Entretanto, para obtenção da forma ( $S$ ) do fármaco por esta rota, são necessárias duas etapas prévias: (1) a esterificação do ibuprofeno racêmico por meio de síntese química convencional e (2) a extração dos ésteres de ibuprofeno formados na primeira etapa. Por outro lado, a esterificação do ( $R,S$ )-ibuprofeno por uma lipase com elevada preferência pelo  $R$ -enantiômero é uma rota alternativa que possibilitaria o isolamento do ( $S$ )-ibuprofeno em um número menor de etapas.(CARVALHO et al., 2005)

Avaliando os resultados deste trabalho pelo critério do valor de  $E$ , verifica-se que o isolado DPUA\_1539 *A. flavo-furcatis* mostrou-se bastante promissor como fonte de lipase para resolução do ibuprofeno racêmico via esterificação enantiosseletiva ( $E = 24,15$ ). Além do valor expressivo do parâmetro  $E$ , a preferência pelo  $R$  enantiômero demonstrada pela lipase desse isolado é, conforme o exposto acima, uma característica altamente desejável na resolução do ( $R,S$ )-ibuprofeno por esterificação (Figura 5) .

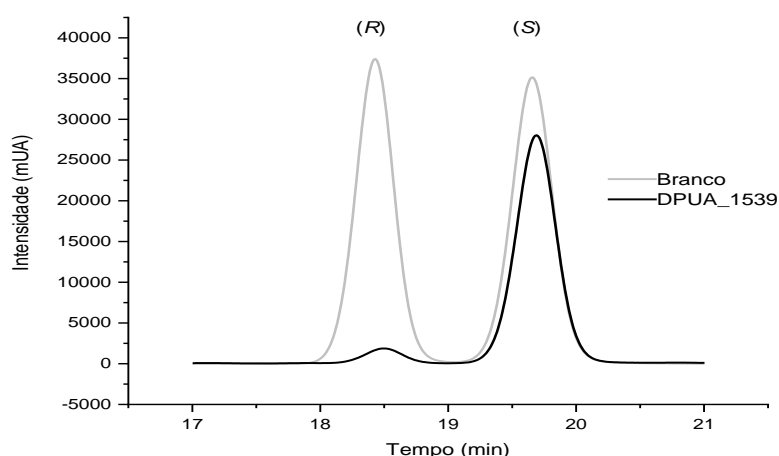


Figura 5 - Enantiopreferência pelo ( $R$ )-enantiômero na reação de esterificação do ibuprofeno racêmico biocatalisada pelo isolado DPUA\_1539 *A. flavo-furcatis*, após 96h de reação

Mohammadi *et al.*,(2018) utilizando a lipase comercial de *Rhizomucor miehei* imobilizada em nanopartículas de sílica para biocatalisar a esterificação do ibuprofeno racêmico, obtiveram E=33,9 com 25,8 % de conversão após 10h de reação. Entretanto, a lipase imobilizada mostrou preferência pelo enantiômero S, tornando necessária uma etapa adicional de hidrólise do éster de (S)-ibuprofeno para obtenção da forma enantiopura do fármaco.

Uma extensa revisão sobre a resolução cinética enzimática do ibuprofeno foi preparada por José, Toledo e Briand (2015). Estas autoras alistaram 26 artigos publicados nos vinte anos anteriores sobre este tema, detalhando os biocatalisadores utilizados (enzimas purificadas ou nativas, imobilizadas ou não), o tipo de solventes e reagentes empregados e os principais resultados obtidos. Apenas três destes trabalhos (CARVALHO *et al.*, 2006; CARVALHO; CONTESINI; IKEGAKI, 2006; CONTESINI; DE OLIVEIRA CARVALHO, 2006) investigaram o uso lipases do gênero *Aspergillus* como biocatalisadores, e o fizeram utilizando somente as enzimas extracelulares precipitadas e liofilizadas. Dos trabalhos sobre resolução enzimática do ibuprofeno aos quais tivemos acesso, apenas Romano *et al.*(2005) testaram a biomassa micelial de um *Aspergillus* (*A. oryzae*) como fonte de lipases para resolução cinética do ibuprofeno, e com um resultado excelente (E =61 após 24h de reação). Os resultados obtidos por Romano *et al.*, bem como os resultados obtidos em nosso trabalho, sugerem que a utilização de lipases ligadas a biomassa de espécies de *Aspergillus* para resolução do ibuprofeno é um campo de investigação promissor e que merece receber mais atenção.

#### 3.4.4 Identificação molecular

A linhagem UEA\_115, por apresentar bons resultados de atividade sintética e atividade enantiosseletiva, teve sua identificação refinada por métodos moleculares. A abordagem molecular para esta linhagem gerou uma sequência de 1129 bp contendo as regiões polimórficas ITS1, ITS2 e D1/D2 com a margem de erro média por base de 0,1% (PHRED Quality Score = 30). A comparação com o banco de dados revelou que essa linhagem pertence à família Botryosphaeriaceae, com identidade de 99% com a espécie *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (códigos de acesso *GenBank* FN645639.1).

### 3.5 CONCLUSÃO

A biomassa de isolados fúngicos amazônicos avaliada neste estudo apresentou atividade de lipase hidrolítica, sintética e enantiosseletiva com potencial para aplicação em diversos campos de biocatálise. Para a maioria dos isolados testados, a biomassa delipidada e cultivada em meio com óleo de oliva mostrou-se o tratamento com resultados mais altos de atividade de hidrólise, quando comparados aos resultados obtidos com a biomassa não-delipidada ou cultivada em meio sem indutor.

A biomassa delipidada das seis linhagens de *Aspergillus* e da linhagem UEA\_115 apresentou elevada atividade de síntese por meio da reação de esterificação do palmitato de etila em meio orgânico, confirmada por duas metodologias diferentes (cromatografia gasosa e espectrofotometria). O isolado DPUA\_1539 *A. flavo-furcatis* apresentou a atividade sintética mais alta entre todos os isolados ( $668,5 \pm 23,5$  mU.g<sup>-1</sup>, de acordo com a cromatografia gasosa). Estes resultados encorajam investigações adicionais destes fungos como potenciais fornecedores de lipase para a produção de biodiesel.

Os ensaios de atividade enantiosseletiva indicaram que o isolado UEA\_115 ( $E= 3,58$ ) e, em especial, o isolado DPUA\_1539 *A. flavo-furcatis* ( $E= 24,15$ ), possuem a capacidade de discriminar os enantiômeros do ibuprofeno racêmico pela síntese de éster, preferencialmente com o (*R*)-enantiômero. Vislumbra-se desse modo a perspectiva de utilização destas linhagens como biocatalisadores na produção de uma formulação enantiopura do fármaco.

### 3.6 AGRADECIMENTOS

À FAPEAM, pelo suporte financeiro na forma de concessão de uma bolsa de doutoramento ao primeiro autor (Edital nº 003/2015).

Aos pesquisadores M.F.S. TEXEIRA (DPUA-UFAM), R.E.L. PROCÓPIO (MBT-UEA), A.A. DAMASCENO (UEA), A.Q.L. SOUZA (FCA-UFAM) e C. SALES-CAMPOS (INPA) por contribuírem com linhagens fúngicas e/ou reagentes, além de outros insumos indispensáveis para a realização deste trabalho.



Aos colaboradores J.N. de SOUZA NETO e F.M.A. da SILVA (CAM-UFAM), E. BACELAR (MBT-UEA) e C.S. de MORAIS (FUCAPI) pelo apoio na análise instrumental.

#### 4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Dentre os isolados avaliados neste estudo, selecionamos DPUA\_1539 *Aspergillus flavo-furcatis* e UEA\_115 como potenciais fornecedores de lipases ligadas a biomassa com enantiosseletividade em meio orgânico. Os valores de *E* na resolução do (*R,S*)-ibuprofeno utilizando a biomassa destes fungos, respectivamente, alcançaram 24,15 e 3,58. Estudos adicionais, como o delineamento fatorial das condições de cultivo da biomassa e das condições da reação de esterificação com o (*R,S*)-ibuprofeno poderão incrementar a enantiosseletividade. A purificação, sequenciamento e expressão heteróloga da lipase ligada a biomassa destes dois fungos também é um possível caminho a ser explorado, visando o desenvolvimento de um processo biocatalítico para obtenção economicamente viável do (*S*)-ibuprofeno.
- Técnicas moleculares estabeleceram uma similaridade de 99% do isolado UEA\_115 com a espécie *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, um fitopatógeno de diversas espécies de fruteiras. Este resultado vai ao encontro do conceito sustentado por alguns autores de que os fitógenos são uma fonte potencial de enzimas para aplicações biotecnológicas (GIBSON et al., 2011; HÉMATY; CHERK; SOMERVILLE, 2009).
- O método de análise por HPLC com coluna quiral utilizado neste trabalho, desenvolvido a partir das propostas de Carvalho e cols (2006) e Siodmiak (2012), mostrou-se eficiente na separação dos enantiômeros *R* e *S* do ibuprofeno e possibilitou o monitoramento da esterificação enantiosseletiva do fármaco.
- A biomassa de cinco linhagens DPUA (398, 1245, 1473, 399 e 613), mesmo não tendo demonstrado enantiosseletividade, exibiu atividade sintética em meio orgânico na reação de transesterificação segundo o ensaio de Teng e Xu. A atividade sintética foi confirmada por espectrofotometria e CG-FID. Assim, as lipases produzidas por estas cinco linhagens evidenciaram potencial para aplicação em outros campos de biocatálise - por exemplo, a obtenção de biodiesel.
- No decorrer da execução do ensaio de transesterificação proposto por Teng e Xu, desenvolvemos um novo método de quantificação via CG-DIC para o palmitato de etila produzido. Os resultados indicam que a metodologia de

quantificação por CG-DIC evita o risco de falsos positivos da quantificação por espectrofotometria. O método espectrofotométrico, apesar de suscetível a resultados falsos positivos, poderia ser empregado como um teste qualitativo num programa de triagem em larga escala de lipases com atividade sintética, visando eliminar as linhagens menos promissoras.

- A biomassa delipidada e cultivada em meio com indutor foi o tratamento que obteve resultados mais altos de atividade de hidrólise para a maioria dos isolados testados, quando comparados aos resultados obtidos com a biomassa não-delipidada ou cultivada em meio sem indutor. Este resultado se deveu provavelmente ao aumento da superfície de contato proporcionado pela eliminação do óleo impregnado no micélio. O resultado sugere também que as lipases ligadas à biomassa podem suportar tratamentos agressivos, como a lavagem com clorofórmio:butanol empregada na delipidação, sem perder sua atividade. Estudos adicionais sobre a capacidade destas lipases de se manterem ativas após vários ciclos de reuso deverão ser feitos, a fim de confirmar a viabilidade de seu aproveitamento em processos industriais. Apesar de eficiente na remoção dos lipídios, a solução clorofórmio:butanol empregada neste trabalho apresenta como desvantagem a geração de resíduos organoclorados. Assim, o desenvolvimento de um método de delipidação da biomassa menos impactante ao ambiente é um alvo altamente recomendável.
- O cultivo da biomassa sem indutor evidenciou a presença de lipase constitutiva em todos os isolados fúngicos testados.

Embora o objetivo principal deste trabalho tenha sido a avaliação e seleção dos isolados fúngicos com atividade sintética enantiosseletiva para a resolução de um fármaco, não se deve desconsiderar o potencial das lipases dos fungos amazônicos para aplicação em campos como desenvolvimento de aromas, fabricação laticínios, produção de manteiga e derivados de leite, processamento de carne e peixes e ração animal. Para o desenvolvimento de aplicações na indústria alimentícia, entretanto, se faz necessário o teste de presença de aflatoxinas, em especial em fungos do grupo *Aspergillus*.

Por fim, recordando que as linhagens fúngicas investigadas nesta tese procederem de coleções de microrganismos, é pertinente ressaltar a importância destas coleções, que abrigam uma significativa parcela da biodiversidade brasileira.

Além de coletar e isolar novos organismos, é preciso conhecer melhor a parcela da biodiversidade já coletada e catalogada. Quantos microrganismos, enzimas e outros metabólitos valiosos já se encontram ao alcance de nossas mãos nestas coleções, apenas esperando, por assim dizer, que descubramos sua utilidade?

## 5 REFERENCIAS

- ABDELRAHEEM, E. M. M. et al. Biocatalysis explained: From pharmaceutical to bulk chemical production. **Reaction Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 11, p. 1878–1894, 2019.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Altschul-1990-Basic Local Alignmen.pdf. **J. Mol. Biol**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 257–270, 2016.
- ANOBOM, C. D. et al. From structure to catalysis: Recent developments in the biotechnological applications of lipases. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- ARANTES, G. M. A computational perspective on enzymatic catalysis. **Quimica Nova**, v. 31, n. 2, p. 377–383, 2008.
- BADENHORST, C. P. S.; BORNSCHEUER, U. T. Getting Momentum: From Biocatalysis to Advanced Synthetic Biology. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 180–198, 2018.
- BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Tailoring Multipurpose Biocatalysts via Protein Engineering Approaches: A Review. **Catalysis Letters**, v. 149, n. 8, p. 2204–2217, 2019.
- BON, E. P. S.; CORVO, M. A.; FERRARA, M. L. **Enzimas em Biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BORNSCHEUER, U. T. et al. Engineering the third wave of biocatalysis. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 185–194, 2012.
- BORNSCHEUER, U. T. The fourth wave of biocatalysis is approaching. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 376, n. 2110, p. 1–7, 2018.
- BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, 2019.
- CARVALHO, P. D. O. et al. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Quimica Nova**, v. 28, n. 4, p. 614–621, 2005.
- CARVALHO, P. D. O. et al. Optimization of enantioselective resolution of racemic

ibuprofen by native lipase from *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 713–718, 2006.

CARVALHO, P. D. O.; CONTESINI, F. J.; IKEGAKI, M. Enzymatic resolution of (R,S)-ibuprofen and (R,S)-ketoprofen by microbial lipases from native and commercial sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 329–337, 2006.

CHEN, C. S. et al. Quantitative Analyses. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 104, p. 7294–7299, 1982.

CIUDAD, G. et al. Innovative approaches for effective selection of lipase-producing microorganisms as whole cell catalysts for biodiesel production. **New Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 375–381, 2011.

COLIN, V. L.; BAIGORÍ, M. D.; PERA, L. M. Mycelium-bound lipase production from *Aspergillus niger* MYA 135, and its potential applications for the transesterification of ethanol. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 236–242, 2011.

CONTESINI, F. J.; DE OLIVEIRA CARVALHO, P. Esterification of (RS)-Ibuprofen by native and commercial lipases in a two-phase system containing ionic liquids. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 17, n. 14, p. 2069–2073, 2006.

CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85–96, 2017.

COSTA, V. E. U.; DE AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 863–873, 1999.

DAIHA, K. DE G. et al. Are lipases still important biocatalysts? A study of scientific publications and patents for technological forecasting. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–20, 2015b.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.

DE CASTRO, F. F. et al. Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus westerdijkiae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, n. April, p. 321–328, 2017.

DE MIRANDA, A. S.; MIRANDA, L. S. M.; DE SOUZA, R. O. M. A. Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 372–393, 2015.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. DE (EDS.). **Fungos: uma introdução à biologia**,

**bioquímica e biotecnologia**. 2a. ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 7th Editio ed. Berlin: Springer-Verlag, 2018.

FABER, K.; KROUTIL, W. A Computer Program for the Determination of the Enantioselectivity (E-Value) in the Kinetic Resolution of Enantiomers. **Selectivity**, v. 1, n. December, p. 5–7, 2012.

FELL, J. W. Rapid identification of yeast species using three primers in a polymerase chain reaction. **Molecular marine biology and biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 174–180, 1993.

FERNANDES, M. L. M. et al. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 1, p. 8–13, 2007.

FERREIRA, J. G. **RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE DIÓIS PROPARGÍLICOS E SUA APLICAÇÃO COMO BLOCOS DE CONSTRUÇÃO DE MOLÉCULAS QUIRAIS BIOATIVAS**. Tese (Doutorado). UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO. Recife, 2016.

FERRER, M. et al. Biodiversity for biocatalysis: A review of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold superfamily of esterases-lipases discovered in metagenomes. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 33, n. 5–6, p. 235–249, 2016.

GANDOMKAR, S. et al. Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on epoxy-functionalized silica. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 550–554, 2015.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. A novel halophilic extracellular lipase with both hydrolytic and synthetic activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, n. September, p. 125–130, 2017.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, n. November 2017, p. 241–253, 2018.

GÉRARD, D. et al. Efficient resolution of profen ethyl ester racemates by engineered *Yarrowia lipolytica* Lip2p lipase. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 28, n. 3, p. 433–441, 2017.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, n. 8, p. 1721–1754, 2007.

GHANEM, A. et al. Lipase-mediated enantioselective kinetic resolution of racemic

acidic drugs in non-standard organic solvents: Direct chiral liquid chromatography monitoring and accurate determination of the enantiomeric excesses. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 7, p. 1063–1074, 2010.

GONAWAN, F. N. et al. Effect of co-solvent addition on the reaction kinetics of the lipase-catalyzed resolution of ibuprofen ester. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 4, p. 672–679, 2013.

GONÇALVES, C. C. S.; FONSECA, F. S. A. Enzyme-catalyzed redox reactions. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 4, p. 778–797, 2018.

GRUNWALD, P. **Industrial Biocatalysis - Inhaltsverzeichnis**. [s.l: s.n.]. v. 1

GUERRAND, D. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. **Oilseeds & fats Crops and Lipids**, v. 24, n. 4, p. 1–7, 2017.

GUERRIERO, G. et al. Destructuring plant biomass: Focus on fungal and extremophilic cell wall hydrolases. **Plant Science**, v. 234, p. 180–193, 2015.

GUPTA, R. et al. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, v. 57, p. 40–54, 2015.

GUTARRA, M. L. E. et al. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5249–5254, 2009.

HABIBI, Z.; MOHAMMADI, M.; YOUSEFI, M. Enzymatic hydrolysis of racemic ibuprofen esters using *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on different supports. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 4, p. 669–676, 2013.

HAMA, S.; NODA, H.; KONDO, A. How lipase technology contributes to evolution of biodiesel production using multiple feedstocks. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 57–64, 2018.

HUDLICKY, T.; REED, J. W. Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 11, p. 3117–3132, 2009.

ILLANES, A. **Enzyme Biocatalysis**. 1. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. v. 1

IMANPARAST, S.; HAMEDI, J.; FARAMARZI, M. A. Enzymatic esterification of acylglycerols rich in omega-3 from flaxseed oil by an immobilized solvent-tolerant lipase from *Actinomyces sediminis* UTMC 2870 isolated from oil-contaminated soil. **Food Chemistry**, v. 245, n. November 2017, p. 934–942, 2018.



- JOSÉ, C.; TOLEDO, M. V.; BRIAND, L. E. Enzymatic kinetic resolution of racemic ibuprofen: past, present and future. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, p. 1–13, 2015.
- KOURIST, R.; HOLLMANN, F.; NGUYEN, G. Biotechnology & Biomedical Engineering Special Issue on Industrial Biotechnology-Made in Germany : The path from policies to sustainable energy , commodity and specialty products Edited by : Cellulosic Ethanol from Agricultural Residues – An Advanced Biof. **JSM Biotechnology and Biomedical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2014.
- KOUTINAS, M. et al. Application of commercial and non-commercial immobilized lipases for biocatalytic production of ethyl lactate in organic solvents. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 496–503, 2018.
- KRUPODOROVA, T. Tetiana Krupodorova \*, Tetiana Ivanova , Victor Barshteyn. n. Tab 1, p. 315–318, 2014.
- LIMA, R. T. et al. Mycelium-bound lipase from *Penicillium citrinum* as biocatalyst for the hydrolysis of vegetable oils. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, n. September, p. 101410, 2019.
- LISBÔA, L. U. D. S. **SELEÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DE PLANTAS DA REGIÃO AMAZÔNICA COMO FORNECEDORES DE LIPASES PARA BIOTRANSFORMAÇÕES**. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, 2006.
- LOO, J. L. et al. Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Geotrichum candidum*. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8556–8570, 2014.
- MANTOVANI, T. R. D. A. et al. Formulação de substratos na produção de biomassa micelial e de lacase de *Pleurotus ostreatus*. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 33, n. 5, p. 1681–1692, 2012.
- MARINONI, L.; PEIXOTO, A. L. As Coleções Biológicas como Fonte Dinâmica e Permanente de Conhecimento sobre a Biodiversidade. **Ciência e Cultura**, v. 62, n. 3, p. 54–57, 2010.
- MAROTTI, B. S. et al. Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. **Química Nova**, 2017.
- MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: A review. **Journal of Biotech Research**, v. 8, p. 58–77, 2017.
- MEHTA, A.; GROVER, C.; GUPTA, R. Purification of lipase from *Aspergillus fumigatus* using Octyl Sepharose column chromatography and its characterization. **Journal of**

**Basic Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 857–866, 2018.

MOHAMMADI, M. et al. International Journal of Biological Macromolecules A novel approach for bioconjugation of Rhizomucor miehei lipase ( RML ) onto amine-functionalized supports ; Application for enantioselective resolution of rac -ibuprofen.

**International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 523–531, 2018.

MOORE, J. C.; BORNSCHEUER, U. T. Editorial overview: Biocatalysis and biotransformation: Riding the third wave of biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, n. 1, p. 5–6, 2014.

NAIK, S. et al. Lipases for use in industrial biocatalysis: Specificity of selected structural groups of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1–4, p. 18–23, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6a. ed. Porto Alegre, RS: ARTMED, 2014.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações Biológicas: Contribuições E Perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742–756, 2009.

PADDON, C. J.; KEASLING, J. D. Semi-synthetic artemisinin: A model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 355–367, 2014.

PEIXOTO, A. L. et al. Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade. **Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos: Ministério da Ciência e Tecnologia**, p. 145–182, 2006.

PÖHNLEIN, M. et al. Development of a microtiter plate-based assay for the detection of lipase-catalyzed transesterifications in organic solvents. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 3, p. 705–710, 2015.

RAST, D. M. et al. Cell wall-associated enzymes in fungi. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 339–366, 2003.

REGNER, E. L. et al. Biomass and Bioenergy Biomass-bound biocatalysts for biodiesel production : Tuning a lipolytic activity from *Aspergillus niger* MYA 135 by submerged fermentation using agro-industrial raw materials and waste products. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, n. February 2018, p. 59–67, 2019.

REINEHR, C. O.; TREICHEL, H. Produção de Lipases com Atividade de Hidrólise por *Aspergillus* Utilizando Subprodutos Agroindustriais , Óleo de Soja e Glicerol Lipases Production with Hydrolytic Activity by *Aspergillus* Using Agroindustrial Byproducts ,

Soy Oil and Glycerol. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, p. 97–115, 2016.

ROMANO, A. et al. Esterification of phenylacetic and 2-phenylpropionic acids by mycelium-bound carboxylesterases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 432–438, 2005.

ROMERO, C. M. et al. Pretreatment of an induced mycelium-bound lipase from *Aspergillus niger* MYA 135 improves its hydrolytic and synthetic activity. **Catalysis Letters**, v. 143, n. 5, p. 469–475, 2013.

RUDROFF, F. et al. Opportunities and challenges for combining chemo- and biocatalysis. **Nature Catalysis**, v. 1, n. 1, p. 12–22, 2018.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 86–96, 2015.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627–662, 2001.

SHELDON, R. A.; BRADY, D. Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis. **ChemSusChem**, p. 1–24, 2019.

SPERB, J. G. C. et al. Análise Qualitativa Da Produção De Lipases E Biossurfactantes Por Fungos Isolados De Resíduos Oleosos. **Engevista**, v. 17, n. 3, p. 385, 2015.

STOYTICHEVA, M. et al. Analytical Methods for Lipases Activity Determination : A Review Analytical Methods for Lipases Activity Determination : A Review. **Current Analytical Chemistry**, v. 8, p. 400–407, 2012.

SU, K.; KA, K.; LAZUR, J. Biology of Macrofungi. p. 129–157, 2018.

SUN, S. Y.; XU, Y. Membrane-bound “synthetic lipase” specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1336–1342, 2009.

SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2607–2612, 2009.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Fungal endophytes: An untapped source of biocatalysts. **Fungal Diversity**, v. 54, p. 19–30, 2012.

TAKAHASHI, J. A. et al. Filamentous fungi and chemistry: Old friends, new allies. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2351–2382, 2017.

TEIXEIRA, M. F. S. et al. (EDS.). **Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada**.

Manaus: EDUA, 2011.

TENG, Y.; XU, Y. A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n. 2, p. 297–299, 2007.

TIMSON, D. J. Four Challenges for Better Biocatalysts. **Fermentation**, v. 5, n. 2, p. 39, 2019.

TORRES, M. et al. Endophytic fungi associated with Mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3328–3333, 2003.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: A flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 95–102, 2005.

WANG, Y.; DAI, C. C. Endophytes: A potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 207–215, 2011.

WOODLEY, J. M. Accelerating the implementation of biocatalysis in industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019.

YADAV, K. N. S. et al. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10663–10670, 2011.

YOUSEFI, M.; MOHAMMADI, M.; HABIBI, Z. Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on epoxy-functionalized silica. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 4, n. 4, p. 550–554, 2014.

YUAN, X. et al. Resolution of (R,S)-ibuprofen catalyzed by immobilized Novozym40086 in organic phase. **Chirality**, v. 31, n. 6, p. 445–456, 2019.

ZAGO, E. et al. Synthesis of Ethylic Esters for Biodiesel Purposes Using Lipases Naturally Immobilized in a Fermented Solid Produced Using *Rhizopus microsporus* Co r. **Energy & Fuels**, v. 28, p. 5197–5203, 2014.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 10, p. 3192–3196, 1985.

ZANOTTO, S. P. et al. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from amazonian fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1046–1059, 2009.

ZHANG, J. H. et al. High-throughput screening of B factor saturation mutated

Rhizomucor miehei lipase thermostability based on synthetic reaction. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, n. 6–7, p. 325–330, 2012.

ZHANG, Z. et al. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 1–2, p. 203–214, 2000.

ZHENG, J. et al. A sensitive colorimetric high-throughput screening method for lipase synthetic activity assay. **Analytical Biochemistry**, v. 452, n. 1, p. 13–15, 2014

## 6 APÊNDICES

### 6.1 ESPÉCIES/GRUPOS TAXONÔMICOS DOS FUNGOS TESTADOS

Tabela 2 - Espécies/grupos taxonômicos dos fungos testados. Dados fornecidos pelos pesquisadores que cederam as linhagens (exceto para UEA\_115).

Entrada	Código	Espécie ou Grupo Taxonômico
1	DPUA_0398	<i>A. niger</i> <sup>1</sup>
2	DPUA_0399	“ <sup>1</sup>
3	DPUA_0613	<i>A. japonicus</i> <sup>1</sup>
4	DPUA_1245	<i>A. foetidus</i> <sup>1</sup>
5	DPUA_1473	<i>A. awamorii</i> <sup>1</sup>
6	DPUA_1539	<i>A. flavo-furcatis</i> <sup>1</sup>
7	UEA_025	<i>Colletrotrichum</i> <sup>1</sup> sp
8	UEA_115	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> <sup>1</sup>
9	UEA_207	<i>Pycnoporus sanguineus</i> <sup>2</sup>
10	UEA_256	Não identificado
11	UEA_361a	“
12	UEA_361b	“
13	UEA_364	“
14	UEA_366	<i>Phomopsis</i> <sup>1</sup> sp
15	UEA_F03	<i>Ganoderma</i> <sup>2</sup> sp
16	UEA_F04	<i>Stereum</i> <sup>2</sup> sp.
17	UEA_F06	<i>Marasmius</i> <sup>2</sup> sp
18	UEA_F07	Não identificado
19	UEA_F08	“
20	UEA_TCUB	<i>T. cubensis</i> <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Identificação/classificação proposta com base em dados de biologia molecular

<sup>2</sup>Identificação/classificação proposta com base em caracteres morfológicos

## 6.2 GALERIA DE IMAGENS

Salvo outra indicação, as imagens/fotos são do arquivo pessoal do autor desta tese



Imagem 1 - Linhagens certificadas do gênero *Aspergillus* cedidas pela coleção do DPVA-UFAM na forma de culturas esporuladas



Imagem 2 - Isolados fúngicos da coleção de trabalho do MBT-UEA, conservados em frascos de penicilina, segundo o método de Castellani

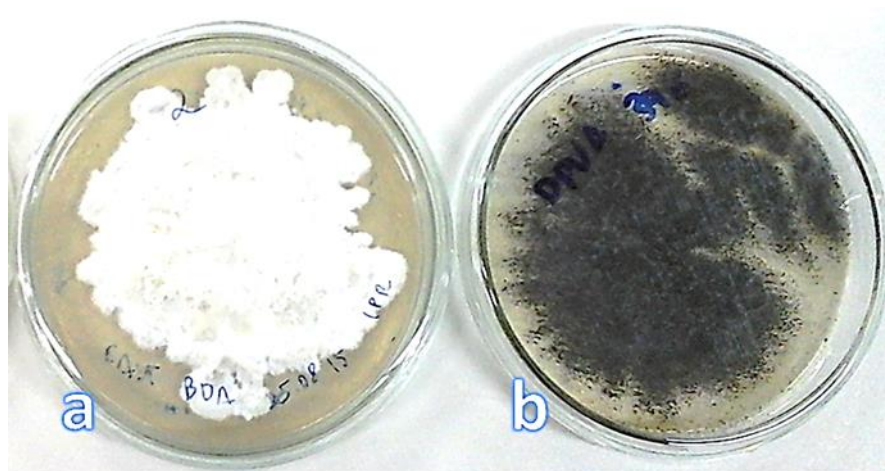


Imagem 3 - Linhagens reativadas por inoculação com micélio vegetativo (a) e com micélio esporulado (b)

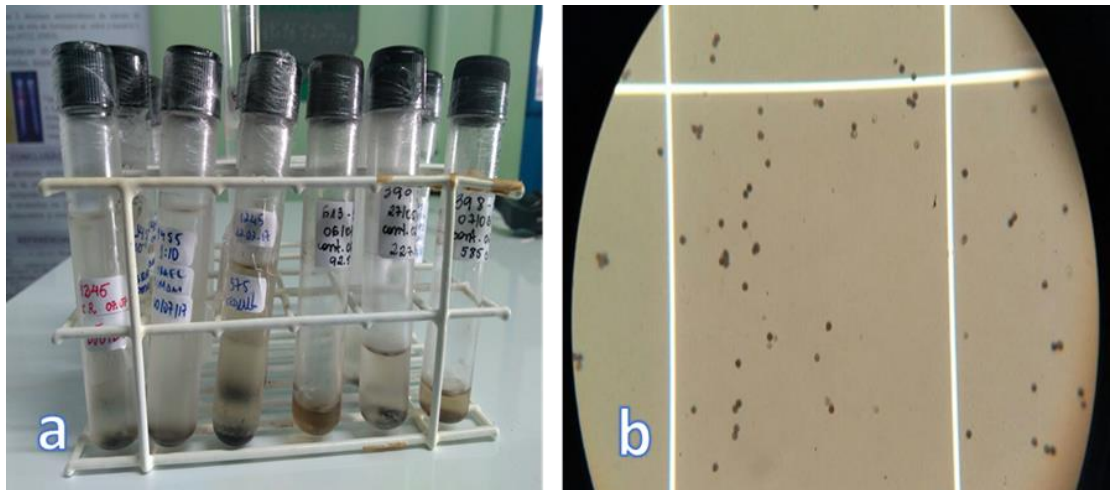


Imagem 4 - Suspensões de esporos usadas na inoculação do meio líquido (a); esporos de *Aspergillus pulverulentus* (DPUA\_1455) em câmara de Neubauer, visualizados com microscópio óptico em aumento de 400x (b)



Imagem 5 – Etapas do cultivo e da preparação da biomassa – cultivo sob agitação em shaker (a); cultivo estático em BOD (b); micélios após o período de crescimento em meio líquido (c); lavagem e filtração dos micélios (d); micélios recém-lavados e filtrados (e); micélios no dessecador (f)



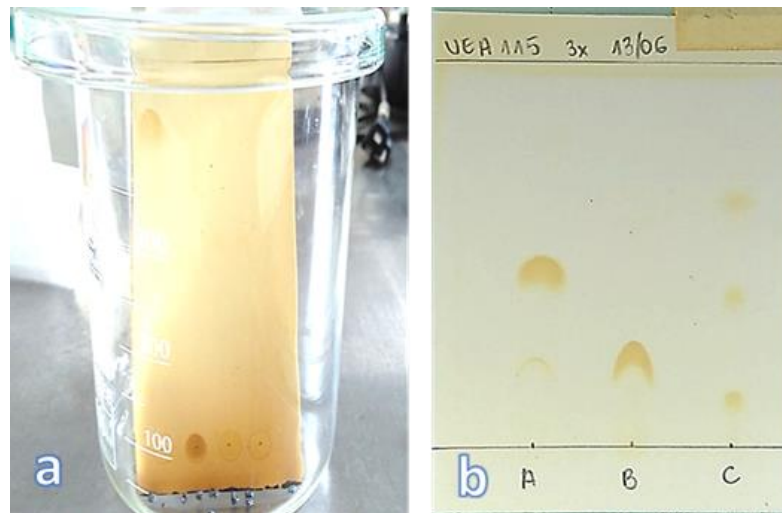


Imagem 6 – Câmara de revelação de placas de CCD, usando grânulos de iodo (a); placa de CCD com três spots, onde A é a solução padrão de óleo de oliva, B é a solução padrão de ácido oleico e C é a amostra coletada após a delipidação do micélio (b)

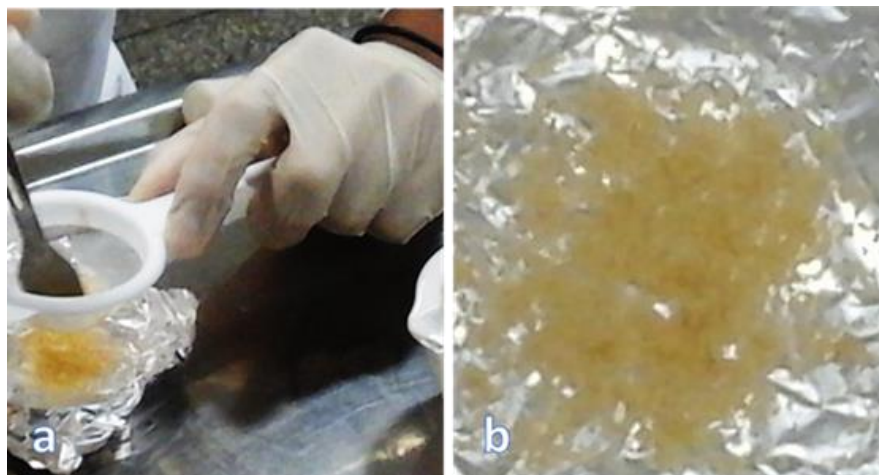


Imagem 7 – Peneiramento do micélio dessecado e triturado (a); biomassa pronta para uso como preparado enzimático bruto de lipases naturalmente imobilizadas (b)

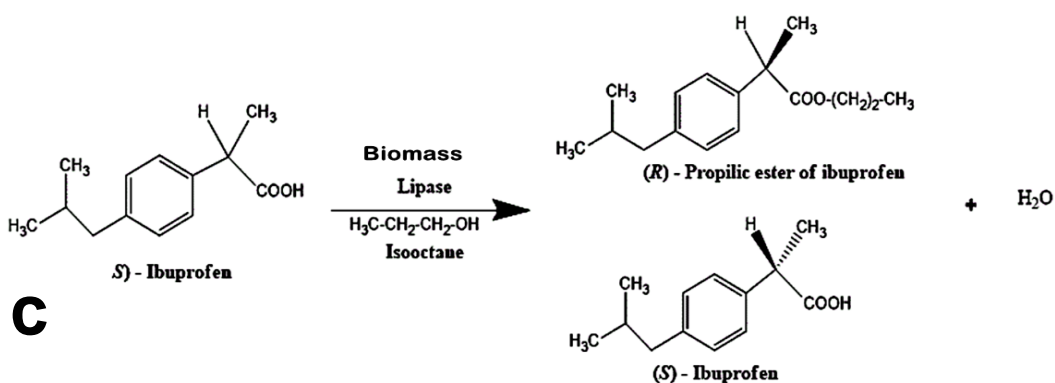
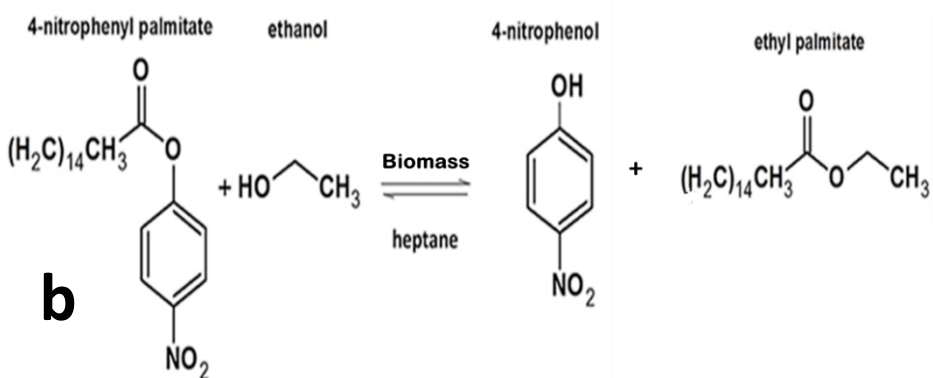
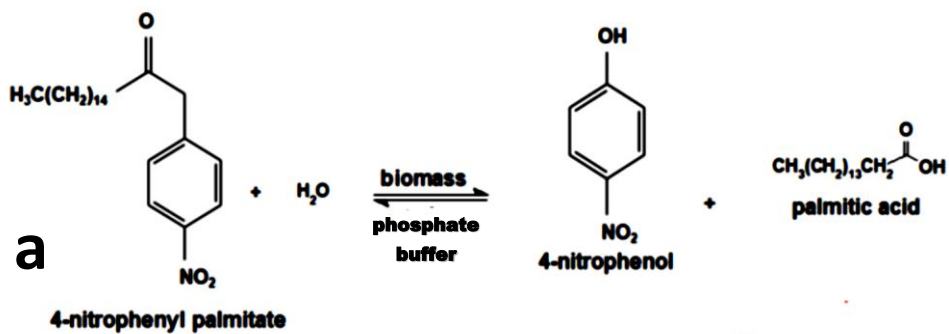


Imagem 8 – hidrólise do palmitato de p-nitrofenila ou pNPP, adaptado de Zanotto e cols, 2009 (a); transesterificação entre pNPP e etanol, produzindo pNP e palmitato de etila (PEt), adaptado de Zanotto e cols, 2009 - (b); esterificação enantiosseletiva do ibuprofeno racêmico, adaptado de Carvalho e cols, 2006 (c)

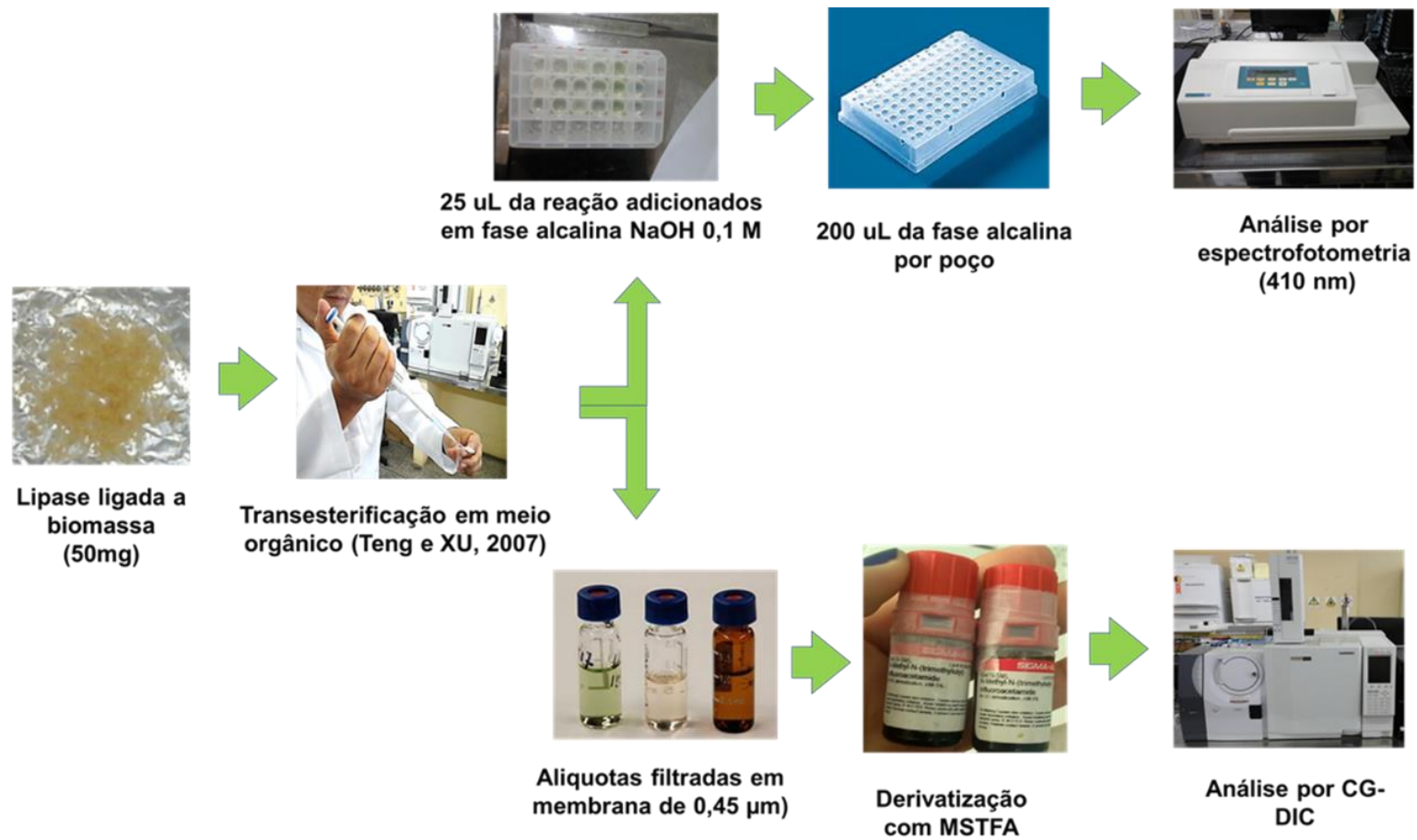


Imagem 9 – Esquema do ensaio de transesterificação e das duas metodologias de quantificação utilizadas neste trabalho

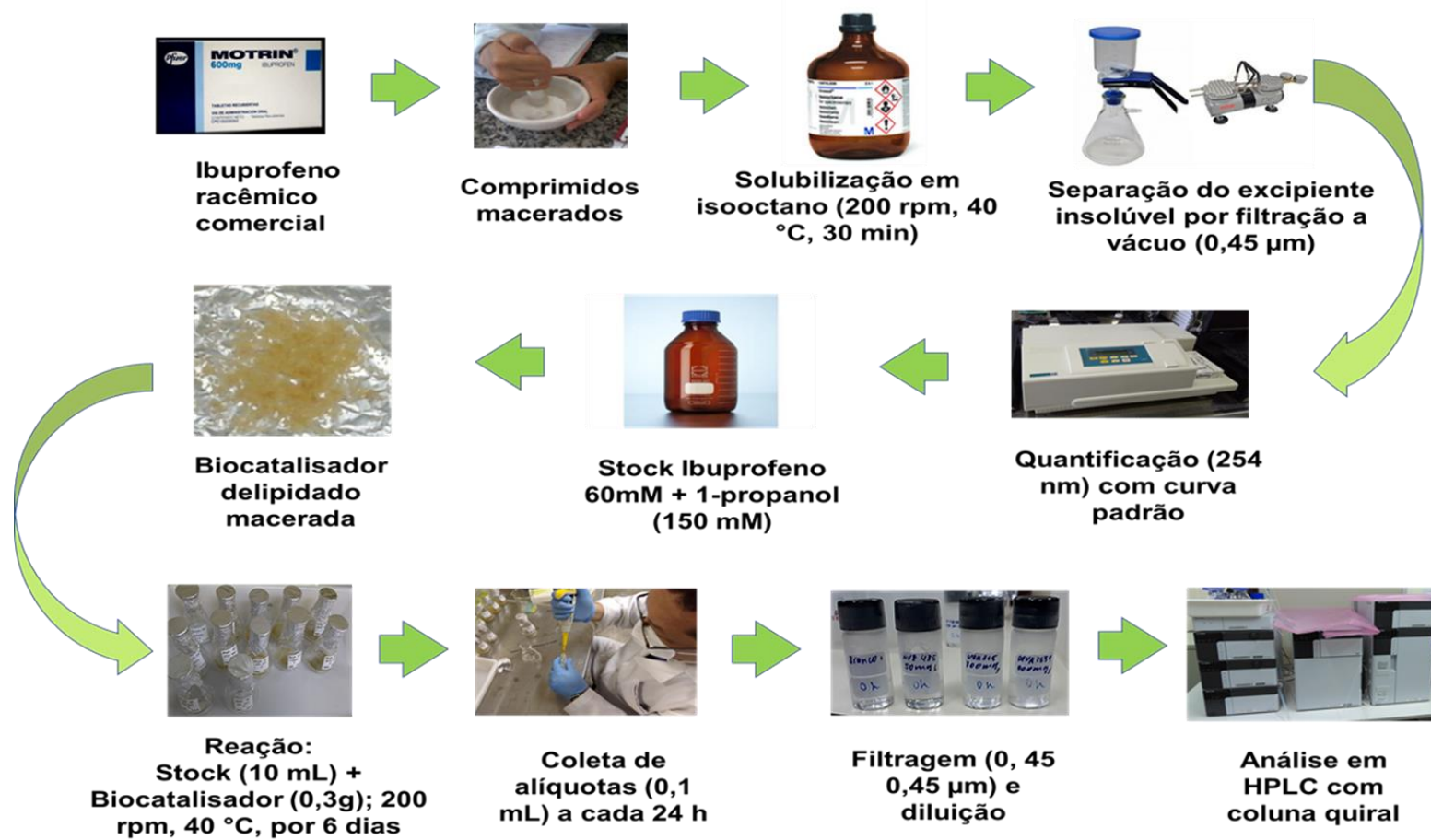


Imagem 10 – Esquema do ensaio de resolução do ibuprofeno e análise por HPLC

## pNP em tampão CF

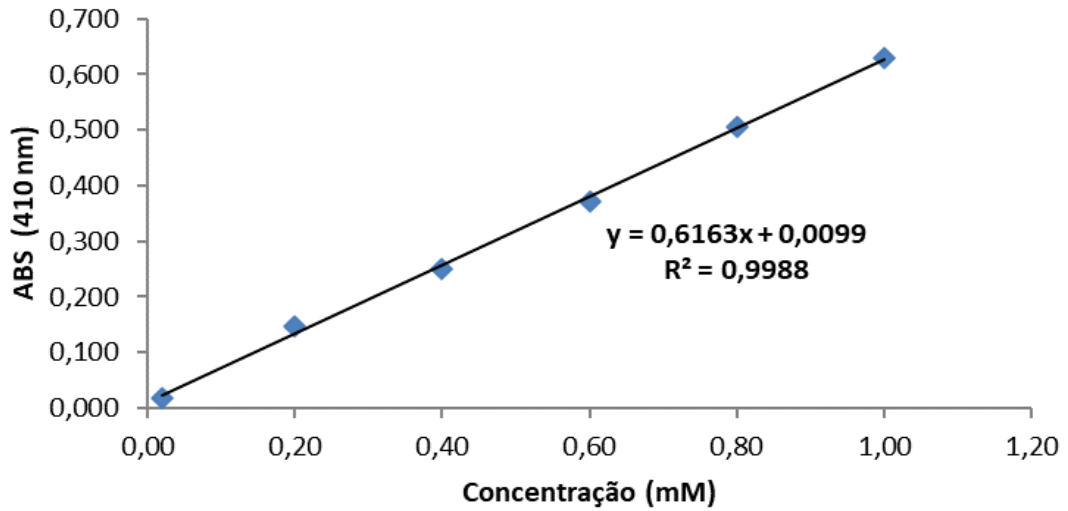


Imagem 11 – Curva padrão do p-nitrofenol (pNP) dissolvido em tampão citrato-fosfato. Cada ponto da curva representa a média de três réplicas

## pNP em heptano

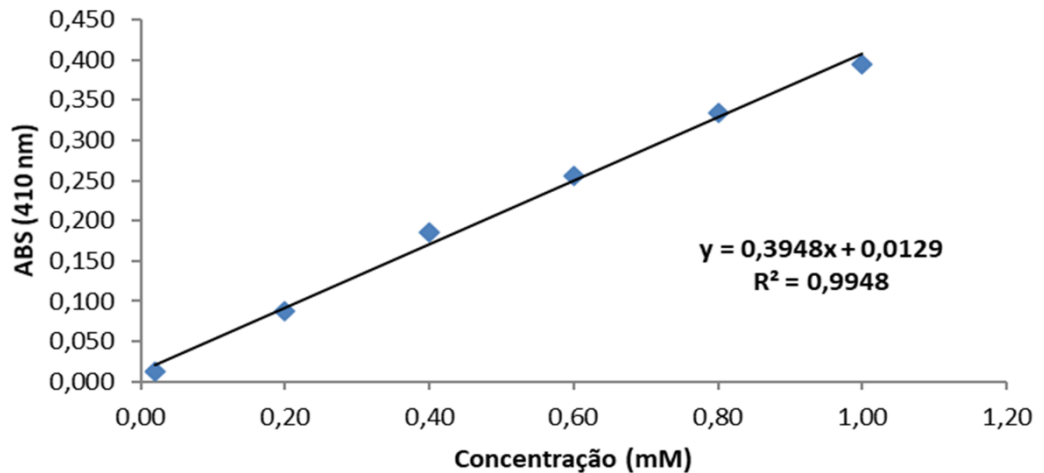


Imagem 12 – Curva padrão pNP dissolvido em heptano. O pNP foi solubilizado por agitação e aquecimento (200 rpm, 40 °C, 48 h). Após resfriamento à temperatura ambiente, 25 µL da solução foram adicionados a 1 mL de NaOH 0,1 M, para extração do pNP para a fase alcalina aquosa. A absorbância foi lida a 410 nm. Cada ponto da curva representa a média de três réplicas.

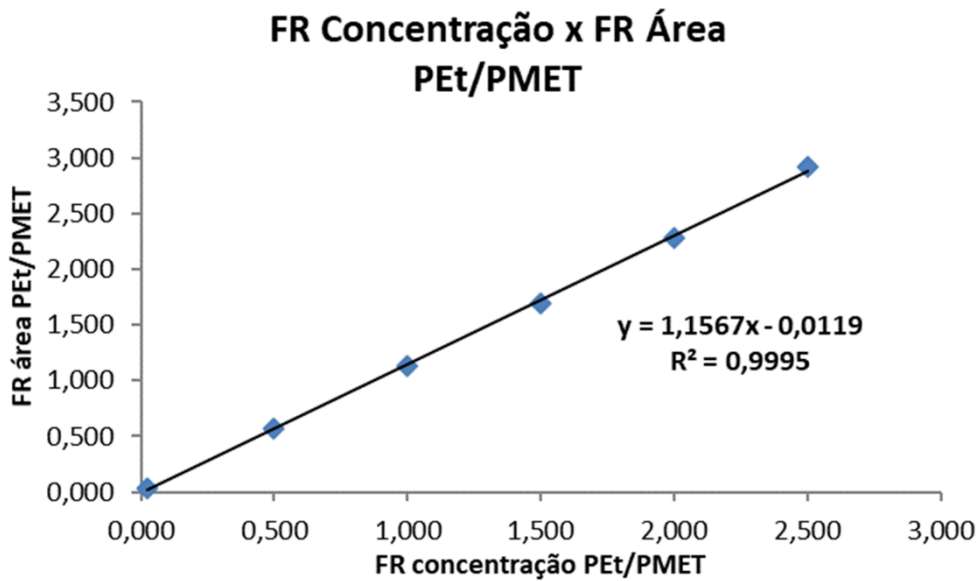


Imagem 13 – Curva padrão do fator de resposta (FR) da concentração x FR da área, relacionando o analito pamicato de etila (PEt) com o padrão interno palmitato de metila (PMET). As áreas dos picos de PEt e PMEt foram obtidos por CG-DIC. Em todos os pontos da curva, a concentração do padrão interno foi fixada em 40 µg.mL<sup>-1</sup>. Em cada ponto da curva, o valor da concentração e da área usado para o cálculo da razão PEt/PMEt foi a média de três réplicas.

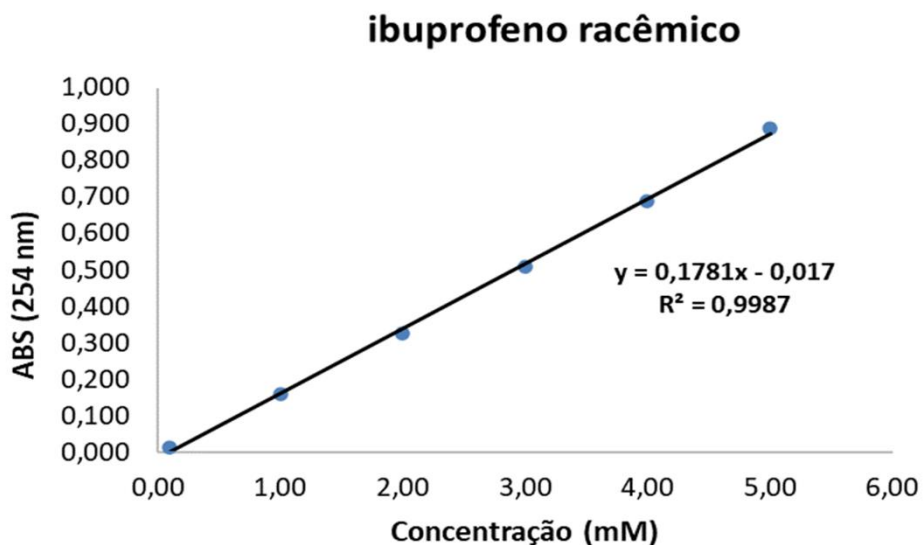


Imagem 14 – Curva padrão do (R,S)-ibuprofeno dissolvido em isooctano.. Cada ponto da curva representa a média de três réplicas.

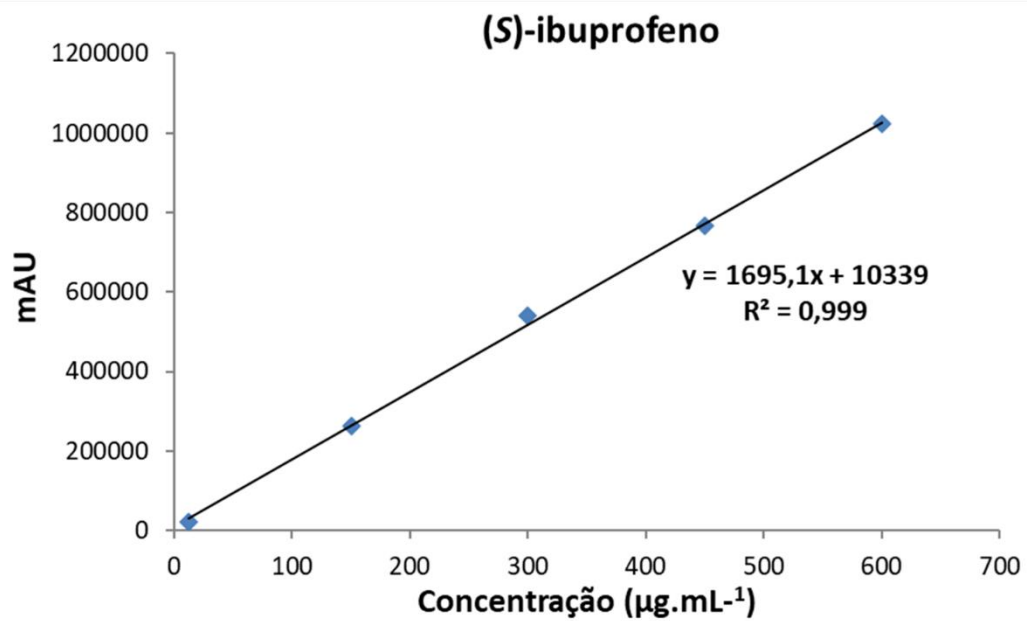


Imagem 15 – Curva padrão do (R.S)-ibuprofeno dissolvido em isooctano e analisado em HPLC/UV-Vis, a 254 nm. Cada ponto da curva representa a média de três réplicas.